

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁷
C07K 14/195

(11) 공개번호 특2001-0052244
(43) 공개일자 2001년06월25일

(21) 출원번호	10-2000-7011206		
(22) 출원일자	2000년10월07일		
번역문제출일자	2000년10월07일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1999/07669	(87) 국제공개번호	WO 1999/51188
(86) 국제출원출원일자	1999년04월07일	(87) 국제공개일자	1999년10월14일
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 감비아 짐바브웨 시에라리온 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 갈 스웨덴 핀란드 사이프러스 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 기네비소 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북 한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽 고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키 스탄 투르크메니스탄 터어키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미 국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스 웨덴 싱가포르 가나 감비아 인도네시아 시에라리온 유고슬라비아 짐 바브웨 크로아티아 인도 아랍에미리트 그레나다 남아프리카		
(30) 우선권 주장	60/080,878 1998년04월07일 미국(US)		
(71) 출원인	9/056,019 1998년04월07일 미국(US) 세인트 주드 칠드런즈 리써치 호스피탈 미국 테네시주 38105-2794 멤피스 노스 라우더데일 스트리트 332 메디윤 인코포레이티드		
(72) 발명자	미국 메릴랜드 20878 게이테르스부르크 웨스트 왓킨스 밀 로드 35 투오마넬레인아이 미국테네시주38139게르만타운도브메도우코브웨스트9600 마수어에이치로버트 미국테네시주38139게르만타운도브메도우코브웨스트9600 비제만테레사엠 미국미들랜드주20878노오스포타막피치리프코트9 존슨레슬릭시드너 미국미들랜드주20874게르만타운엠베서더드라이브13545 괴니히스콧 미국미들랜드주20852록크빌랄스톤로드10901		
(74) 대리인	이병호		

심사청구 : 없음

**(54) N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산을포함하는 폴리펩티드, 이로부터 유도된 백신 및
이의 용도**

요약

본 발명은 서열 1, 3 내지 7 또는 9 내지 11에 기술된 아미노산 서열을 갖는, N-말단 콜린 결합 단백질 A의 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 동족체 또는

유도체를 포함한다. 또한 본 발명은 아미노산 서열이 서열 24의 것이고 폴리펩티드가 이의 천연 3차 구조를 갖는, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드 및 이의 제조 방법을 제공한다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하는데, 이때, 폴리펩티드는 렉틴 활성을 보유하고 콜린에 결합하지 않는다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 면역원 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 최종적으로 본 발명은 약제학적 조성물, 백신 및 진단 및 치료학적 방법에서의 용도를 제공한다.

대표도

도1

색인어

폐렴구균, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물, 콜린, 렉틴

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 폴리펩티드에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 세균 감염, 특정하게는 뉴모코커스(*pneumococcus*)에 대한 보호를 제공하거나 이러한 감염에 대한 보호 항체를 유도하는 백신, 및 진단 및 수동 면역요법에 사용하기 위한, 상기 폴리펩티드에 대한 항체 및 길 항체에 관한 것이다. 당해 폴리펩티드 및/또는 이러한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 또한, 뉴모코커스의 세균성 유착의 경쟁적 억제제로서 유용하다. 마지막으로, 본 발명은 이러한 폴리펩티드를 사용하는 치료법에 관한 것이다.

배경기술

스트렙토코커스 뉴모니애(*Streptococcus pneumoniae*)는 패혈증, 수막염, 중이염 및 대엽성 폐염과 같은 침입성 감염의 주요 원인인 그람 양성 세균이다[참조: Tuomanen et al NEJM 322:1280-1284, 1995]. 뉴모코커스는 상단 및 하단 기도 세포에 친화적으로 결합된다. 대부분의 세균과 마찬가지로, 뉴모코커스가 사람 세포에 유착하는 것은 진핵성 탄수화물에 레시틴-유사 방식으로 결합되는 세균성 표면 단백질의 발현에 의해 이루어진다[참조: Cundell, D. & Tuomanen, E. (1994) *Microb Pathog* 17:361-374]. 뉴모코커스는 염증이 유발되지 않은 상피에 결합되는데, 이는 무증후성 캐리지(asymptomatic carriage)로서 여겨질 수 있는 과정이다. 침입성 질환으로의 전환은 사람 세포를 활성화시키면서 이러한 사람 세포 상에서 이용될 수 있는 수용체의 수와 형태를 변화시키는 염증 인자가 국부적으로 발생하는 것을 포함한다고 제안된 바 있다[참조: Cundell, D. et al. (1995) *Nature*, 377:435-438]. 이러한 새로운 설정에서 한 가지 가능성으로 제시된 것은 뉴모코커스가 이들 비-조절된 수용체, 즉 혈소판 활성화 인자(PAF) 수용체의 이점을 나타내고 이들 중의 하나와 관계된 것으로 여겨진다는 것이다[참조: Cundell et al. (1995) *Nature*, 377:435-438]. PAF 수용체가 나타날지 수 분 이내에, 뉴모코커스는 한층 더 고조된 유착과 침입을 진행하게 된다. 예를 들면, 가용성 수용체 동족체에 의해, 활성화된 세포에 대한 세균성 결합을 억제시키는 것은 동물 모델에서 질환으로의 진행을 차단시켜준다[참조: Idanpaan-Heikkila, I. et al. (1997) *J. Infect. Dis.*, 176:704-712]. 이와 관련하여 특히 유효한 것은, 시험관 내에서 사람 세포에 대한 뉴모코커스성 부착을 억제하고 생체 내에서 폐에서의 전이증식을 억제시키는 부가의 시알산을 지니거나 지니지 않는 락토-N-네오테트라오제를 함유하는 가용성 탄수화물이다.

콜린 결합 단백질: 후보 구조 유착 유전자:

뉴모코커스는 세포벽 테이코산 또는 리포테이코산에 대한 비-공유 결합에 의해 세균성 표면에 결합할 수 있는 표면 단백질 계열을 생성한다. 스트렙토코커스 뉴모니애의 표면을 포스포릴콜린에 비-공유적으로 결합되는 CBPs(콜린 결합 단백질) 계열로 덮는다. CbpA는 키메라 구조를 나타내는 75kD 표면-노출된 콜린 결합 단백질이다. 이에는 독특한 N-말단 도메인 프롤린 풍부 영역에 이어서 콜린에 대한 결합과 관련된 10개의 반복 영역으로 구성된 C-말단 도메인이 있다.

CbpA는 진핵 세포의 표면 상에 존재하는 당접합체 함유 수용체에 대한 유착물(리간드)이다. cbpA에 결합 있는 돌연변이체는 비인두 전이증식에 대한 미성숙 랫트 모델에서 발병력 저하를 나타내었다. 이러한 결합은 테이코산으로 덮혀진 콜린 결정기에 대해 지시된 것이며 이러한 단백질 계열의 구성원 각각에서 특징적인 콜린 결합 도메인에 의해 매개된다. 이러한 콜린 결합 도메인은 로페즈(Lopez) 등의 자기분해성 효소에 관한 연구에서 발견되었고 이의 특징이 완전히 확인되었다[참조: Ronda et al.(1987) *Eur. J. Biochem*, 164:621-624]. 이러한 도메인을 함유하는 기타 단백질에는 뉴모코커스성 파아지의 오토리신 및 보호성 항원인 뉴모코커스성 표면 단백질 A(PspA)가 포함된다[참조: Ronda, C. et al. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 164:621-624 and McDaniel, L.S., et al. (1992) *Microb. Pathog*, 13:261-269]. CbpA는 이의 기타 계열과 공유되지만 이의 사람 세포에 대한 결합 활성이 이의 독특한 N-말단 도메인으로부터 발생하는 비인강 도메인을 전이증식시키지 못한다. 이러한 전이증식 과정과 질환으로의 진행이, 1차 단계로서 사람 세포에 대한 뉴모코커스성 부착에 좌우되기 때문에, 교차 반응성 항체 또는 이러한 도메인을 모사하는 펩티드와의 경쟁적 억제에 의해 상기 N-말단 도메인의 기능을 방해하는 것이 질환을 차단하는데 중요할 수 있다.

항-뉴모코커스성 백신에 대한 콜린 결합 단백질은 PCT 국제특허출원 PCT/US 97/07198에 기재되어 있고, 이러한 PCT 출원은 본원에 참조문헌으로 삽입되어 있다. 에스. 뉴모니애(*S. pneumoniae*)에 대한 현재 이

용되는 백신은 상기 세균의 가장 공통적인 23개 혈청형 캡슐의 정제된 탄수화물을 이용하고 있지만, 이러한 백신은 예방율이 단지 50% 정도이고[참조: Shapiro et al. NJEM 325:1455, 1991] 2세 이하에서는 면역 원성이 아니다. 추가로, 치료학적 폴리펩티드는 다중 내성 유기체로의 감염의 경우에는 치료학적 옵션을 부여할 수도 있다. 따라서, 본 발명은 예방용 백신을 제공함으로써 오래전부터의 필요를 충족시켜준다.

발명의 요약

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 폴리펩티드는 서열 1, 3 내지 7 또는 9 내지 11에 제시된 아미노산 서열, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 동족체 또는 유도체를 포함한다. 또한, 본 발명은 서열 24에 제시된 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드, 및 이러한 폴리펩티드의 제조 방법을 제공한다. 당해 분리된 폴리펩티드는 동물과 사람을 세균 감염, 바람직하게는 뉴모코커스 감염으로부터 면역시키는데 사용하기에 적합하다.

추가로, 본 발명은 레시틴 활성은 지니지만 콜린 결합 활성은 지니고 있지 않는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 면역원성 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물 또는 이의 단편을 제공한다.

또한, 본 발명은 당해 분리된 폴리펩티드를 암호화하거나 이러한 폴리펩티드의 활성을 경쟁적으로 억제시키는 분리된 핵산, 예를 들면, 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자, 또는 이의 변성 변이체, 돌연변이체, 동족체 또는 단편에 관한 것이다. 바람직하게는, 이의 변성체, 변이체, 돌연변이체, 동족체 또는 단편을 포함하는 분리된 핵산은 서열 12, 14 내지 17, 19 내지 22 또는 23에 제시된 서열을 갖는다. 본 발명의 추가의 양태에서는, 이와 같이 결정된 재조합 DNA 분자 또는 클로닝된 유전자의 완전한 DNA 서열을, 적당한 숙주 내로 도입될 수 있는 발현 조절 서열과 작동적으로 연결시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 클로닝된 유전자 또는 재조합 DNA 분자로 형질전환된 단세포 숙주, 본 발명을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 분자, 및 더욱 특히, 앞서 제시된 바와 같은 서열로부터 결정된 DNA 서열 또는 이의 단편을 포함한다.

이러한 분리된 폴리펩티드에 대한 항체에는 천연으로 발생된 항체 및 재조합적으로 제조된 항체가 포함된다. 이들은 공지된 유전 공학 기술에 의해 제조된 폴리클로날 및 모노클로날 항체 뿐만 아니라 이중-특이적(키메릭) 항체, 및 경쟁 제제로서 작용하는 것을 포함하지만 이에 제한되지는 않는 세균성 유착을 조절하는 능력과 연계해서 진단용으로 사용하도록 만드는 기타 작용기를 포함하는 항체를 포함할 수 있다.

본 발명의 추가의 목적은 침입성, 자발성 또는 특발성 병리학적 상태의 불리한 결과를 치료하거나 피하도록, 상기 세균 또는 이의 아단위의 양 또는 활성을 억제하기 위해 포유류를 치료하는 방법을 제공하는 것이다. 본 발명은 당해 분리된 폴리펩티드, 이의 아단위 또는 결합 파트너를 포함하거나 이에 근거한 치료법에 사용하기 위한 약제학적 조성물을 제공한다.

마지막으로, 본 발명은 약제학적 조성물, 백신, 및 이의 진단 및 치료 방법 용도를 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 및 재조합 절단물 R1(도 2에 제시된 바와 같은 CbpA의 N-말단으로부터 약 16번 아미노산 내지 321번 아미노산) 및 R2(도 2에 제시된 바와 같은 CbpA의 N-말단으로부터 약 16번 아미노산 내지 444번 아미노산)을 도식적으로 나타낸 것이다. 도메인 A는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 153번 아미노산 내지 321번 아미노산이고; 도메인 B는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 270번 아미노산 내지 326번 아미노산이며; 도메인 C는 도 2에 제시된 바와 같은 CbpA 아미노산 서열의 N-말단으로부터 약 327번 아미노산 내지 433번 아미노산이다.

도 2A 내지 B는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 각종 혈청형의 상동성을 비교한 것이다.

도 3은 재조합 R1 및 R2의 발현과 정제를 도시한 것이다.

도 4는 마우스에서의 수동 보호 결과를 나타낸 것이다. 재조합 R2에 대한 면역 혈청은 치사 에스. 뉴모니에 챌린지로부터 마우스를 보호하였다.

도 5는 LNT-HSA 피복된 플레이트에 대한 R6x 유착에 대한 항-R2 항체의 역가 측정을 나타낸 것이다.

도 6은 LNT-HSA 피복된 플레이트에 대한 뉴모코커스성 유착을 차단하는 활성에 대한 항-CbpA 및 흡착된 항-CbpA 항체의 역가 측정을 나타낸 것이다.

도 7은 마우스에서의 능동 보호 결과를 나타낸 것이다. 재조합 R1에 대한 면역 혈청은 치사 에스. 뉴모니에 챌린지로부터 마우스를 보호하였다(챌린지 560cfu 혈청형 6B).

발명의 상세한 설명

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드에 관한 것이다. 당해 폴리펩티드는 뉴모코커스성 감염에 대하여 동물을 면역시키는데 사용하기에 적합하다. 이들 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 단편은 이들이 적당한 보조제와 제형화된 경우, 뉴모코커스에 대한 백신 및 교차 반응성 단백질을 이용한 기타 세균에 대한 백신에 사용된다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 폴리펩티드는 서열 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 아미노산 서열, 이의 단편, 돌연변이체, 변이체, 동족체 또는 유도체를 포함한다. 또 다른 양태에서, 당해 폴리펩티드는 아미노산 KXXE(서열 6)을 갖는다.

본 발명은 도 2에 제시된 바와 같은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리

된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 이러한 폴리펩티드는 도 2에 제시된 바와 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들면, 이러한 보존된 영역에는 아미노산 서열 158 내지 210; 158 내지 172; 300 내지 321; 331 내지 339; 355 내지 365; 367 내지 374; 379 내지 389; 409 내지 427; 및 430 내지 447이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 도 2는 본 발명에 의해 고려되는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 각종 혈청형의 상동성을 비교한 것이다.

추가로, 본 발명은 서열 24에 제시된 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 상기 폴리펩티드는 이의 동족체, 단편, 돌연변이체 또는 변이체이다. 고려된 변이체가 도 2에 제시되어 있다. 본 발명은 또한, 도 2에 제시된 바와 같은 혈청형 4의 약 16번 내지 약 475번 아미노산 또는 도 2에 제시된 바와 같은 혈청형 4의 상응하는 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 3차 구조는 본래의 단백질에 존재하는 것에 상응한다.

폴리펩티드의 제조방법은, 예를 들면, 다음과 같다: 콜린 결합 단백질 A의 전체 길이를 하이드록실아민으로 절단하는데, 하이드록실아민은 콜린 결합 단백질 A를 혈청형(serotype) R6x 및 혈청형 4의 위치 475에서 아미노산 아스파라긴(N)에서 절단하거나 도 2에 도시한 상이한 혈청형에서 혈청형 R6x 또는 혈청형 4의 상응하는 아미노산을 절단함으로써 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단형을 제조한다. 절단된 콜린 결합 단백질 A 또는 이의 단편을 제조하거나 본연의 3차 구조를 유지시키는(즉, 콜린 결합 단백질 A의 전체 길이) 대체 방법이 예측되고 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 폴리펩티드가 이의 3차 구조를 유지하기 때문에, 분리된 폴리펩티드는 박테리아 감염, 바람직하게는 폐렴구균에 대해 동물과 사람에게 면역성을 주는 면역원으로 사용되기에 적합하다.

콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 아미노산 서열은 다음과 같다:

**ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKKIVGESY
AKSTKKRHTTIVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQIQILMMESRSKVDEAV
SKFEKDS SSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEKKAKD
QKEEDRRNYPTTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEP RDEQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAE EAKRRADAKEQGKPKGRAKRGVPGEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVVEEAKKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAE
VESKKAEA TRLEKIKTDRKKA EEEAKRKA AEEDKVKEKPAEQQPAPAPKAE
KPAPAPKPEN (SEQ ID NO 24).**

"폴리펩티드 R2"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4(도 1)의 N-말단 절단형의 위치 16 내지 위치 444의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKKIVGESY
AKSTKKRHTTIVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQIQILMMESRSKVDEAV
SKFEKDS SSSSSSDSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEKKAKD
QKEEDRRNYPTTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEP RDEQKIKQAE
AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAE EAKRRADAKEQGKPKGRAKRGVPGEL
ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLKPEKKVAEAEKKVVEEAKKKAEDQKE
EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAE
VESKKAEA TRLEKIKTDRKKA EEEAKRKA AEEDKVKEKPA (SEQ ID NO 1).**

콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절단물의 폴리펩티드 R2를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
AAGTCAGGCAGAACAAGGAGAACAACCTAAAAAACTCGATTCAGAACGA
GATAAGGCAAGGAAAGAGGTCGAGGAATATGTAAAAAAATAGTGGGTG
AGAGCTATGCAAATCAACTAAAAAGCGACATACAATTACTGTAGCTCTA
GTTAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
ATCAACCTCAGAAAGCCAACACTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
GTTCAGACTCTTCCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTG
AAGAAGCTGAGAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCG
ATGTGGAAGTTAAAAAGCGGAGCTTGAAC TAGTAAAAGTGAAAGCTAA
CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAG
AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGTG
AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
GTAAACCAAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAGCAAC
ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG
AAGAACTCTTCCAAGCCCATCCCTGAAACCAGAAAAAAGGTAGCAGA
AGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAAGCCGAGGATCAAAAA
GAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTGAAC
TGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAAAAAAGCGGAGCTTGAAC TAG
TAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAGC
AAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAA
ATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCAG
CAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTG (SEQ ID NO 12).

혈청형 4의 CbpA의 아미노산 서열:

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSEKDKARKEVEEYVKKIVGESY
 AKSTKKRHTITVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSESQIQILMMESRSKVDEAV
 SKFEKDSSSSSSSSSTKPEASDTAKPNKPTEPGEKVAEAKKKVEEAEEKKAKD
 QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELVVKVANEPRDEQKIKQAE
 AEVESKQAEATRLKIKTDREEAEKRRADAKEQGKPKGRAKRGVPGEL
 ATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKE
 EDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAE
 VESKKAETRLEKIKTDRKKAEEEAKRKAEEEDKVKEKPAEQQPAPAPRAE
 KPAPAPKPENPAEQPKAEKPADQAEEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKTEKPA
 QPSTPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMATGWLQNNGSWYYLNSNGAMATG
 WLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQYNGS
 WYYLNANGSMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATGWVKDGDWYYLEAS
 GAMKASQWFKVSDKWYVNGSGALAVNTTVDGYGVNANGWVN. (SEQ ID
 NO 2)

CbpA 혈청형 타입 4의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열:

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
AAGTCAGGCAGAACAAGGAGAACAACCTAAAAAACTCGATTCAGAACGA
GATAAGGCAAGGAAAGAGGTCGAGGAATATGTAAAAAAATAGTGGGTG
AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAAGCGACATAACAATTACTGTAGCTCTA
GTTAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
ATCAACCTCAGAAAGCCAACACTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTGAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
G TTCAGACTCTTCCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTG
AAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTTGAAATTGCTGAGTCCG

ATGTGGAAGTTAAAAAAGCGGAGCTTGA Δ CTAGTAAAAGTGAAAGCTAA
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAG
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAATCAAGACAGATCGTG
 AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
 GTAAACCAAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAGCAAC
 ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG
 AAGAACTCTTCCAAGCCATCCCTGAAACCAGAAAAAAGGTAGCAGA
 AGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAGCCGAGGATCAAAAA
 GAAGAAGATCGCCGTAAC Δ CCCAACCAACTTACAAAACGCTTGA Δ CT
 TGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAGTTAAAAAAGCGGAG Δ CTTGA Δ CTA
 GTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAG
 CAAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAA
 AATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA
 GCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTGAACAACCACAACCAG
 CGCCGGCTCCAAAAGCAGAAAAACCAGCTCCAGCTCCAAAACCAGAGAA
 TCCAGCTGAACAACCAAAAGCAGAAAAACCAGCTGATCAACAAGCTGAA
 GAAGACTATGCTCGTAGATCAGAAGAAGAATATAATCGCTTGACTCAACA
 GCAACCGCCAAAAACTGAAAAACCAGCACAACCATCTACTCCAAAAACA
 GGCTGGAAACAAGAAAACGGTATGTGGTACTTCTACAATACTGATGGTTC
 AATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAAtGGCTCA Δ tGGTAcTAcTCAACAG
 CAATGGCGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCATGGTACT
 ATCTAAACGCTAATGGTTCATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGT
 TCAATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTTCATGGCGACAGGATGGCTCCA
 ATACAATGGCTCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTTCATGGCGACAG
 GATGGCTCCAATACAATGGCTCATGGTACTACCTAAACGCTAATGGTGT
 ATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGATACCTGGTACTATCTTGAAGC
 ATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTTCAAAGTATCAGATAAATGGT
 ACTATGTCAATGGCTCAGGTGCCCTTGCAGTCAACACA Δ CTGTAGATGGC
 TATGGAGTCAATGCCAATGGTGAATGGGTAAACTAA (SEQ ID NO 13).

"폴리펩티드 R1"은 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절단형의 위치 16 내지 위치 321의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

ENEGATQVPTSSNRANESQAEQGEQPKKLDSE Δ DKARKEVEEYVKKIVGESY
 AKSTKKRHTITVALVNELNNIKNEYLNKIVESTSES Δ QLQILMMESRSKVDEAV
 SKFEKDS Δ SSSSSSDSS Δ TKPEASDTAKPNKPTPEGEKVAEAKKKVEEA Δ EKKAKD
 QKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKVKANEP Δ RDEQKIKQAE
 AEVESKQAEATRLKKIKTDREEAE Δ EEAKRRADAKEQ Δ GKPKGRAKRGVPGEL
 ATPDKKENDAKSSDSSVGEETL (SEQ ID NO 3).

폴리펩티드 R1을 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAGAACGAGGGAGCTACCCAAGTACCCACTTCTTCTAATAGGGCAAATGA
 AAGTCAGGCAGAACAAGGAGAACAACCTAAAAAACTCGATTGAGAACGA
 GATAAGGCAAGGAAAGAGGTCGAGGAATATGTAAAAAAAATAGTGGGTG
 AGAGCTATGCAAAATCAACTAAAAAGCGACATACAATTAAGTGTAGCTCTA
 GTTAACGAGTTGAACAACATTAAGAACGAGTATTTGAATAAAATAGTTGA
 ATCAACCTCAGAAAGCCAACACTACAGATACTGATGATGGAGAGTCGATCAA
 AAGTAGATGAAGCTGTGTCTAAGTTTGAAAAGGACTCATCTTCTTCGTCAA
 GTTCAGACTCTTCCACTAAACCGGAAGCTTCAGATACAGCGAAGCCAAAC
 AAGCCGACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTG
 AAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAA
 CTACCCAACCATTACTTACAAAACGCTTGAAGTTGAAATTGCTGAGTCCG
 ATGTGGAAGTTAAAAAAGCGGAGCTTGAAGTAGTAAAAGTGAAAGCTAA
 CGAACCTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAG
 AGTAAACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGTG
 AAGAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAGAGCAGATGCTAAAGAGCAAG
 GTAAACCAAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAGCAAC
 ACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTAGGTG
 AAGAAACTCTTC (SEQ ID NO 14).

"폴리펩티드 C/R2"는 반복 영역 C가 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절단형의 위치 327 내지 위치 433의 아미노산 서열을 포함하는, R2 내에 반복 단위 C를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

KPEKKVAEAEKKVVEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVK
 KAELELVKEEAKPRNEEKVKQAKAEVESKKAEATRLEKIKTDRKKAEFEAK
 RKA (SEQ ID NO 4).

폴리펩티드 C/R2의 DNA 서열:

AAACCAGAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTA
 AGAAAAAAGCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAAC
 CAATACTTACAAAACGCTTGAAGTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGGAAG
 TTAAAAAAGCGGAGCTTGAAGTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG
 AAACGAGGAAAAAGTTAAGCAAGCAAAAGCGGAAGTTGAGAGTAAAAAA
 GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAAAATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAG
 AAGAAGAAGCTAAACGAAAAGCA (SEQ ID NO 15)

"폴리펩티드 A/R2"는 반복 영역 A가 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 4의 N-말단 절단형의 위치 153 내지 위치 269의 아미노산 서열을 포함하는, R2 내에 반복 단위 A를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

TEPGEKVAEAKKKVVEAEKKAKDQKEEDRRNYPTITYKTLELEIAESDVEVK
 KAELELVKVKANEPREDEQKIKQAEAEVESKQAEATRLKIKTDREEAEFEAK
 RRADA (SEQ ID NO 5).

도 1에 도시된 바와 같이, 폴리펩티드 R2의 영역 A는 R1 내에서도 같은 영역 A와 동일하다.

폴리펩티드 A/R2를 암호화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

**ACAGAACCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAA
GCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACC
CAACCATTACTTACAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTCCGATGTG
GAAGTTAAAAAAGCGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGTGAAAGCTAACGAAC
CTCGAGACGAGCAAAAAATTAAGCAAGCAGAAGCGGAAGTTGAGAGTAA
ACAAGCTGAGGCTACAAGGTTAAAAAAAATCAAGACAGATCGTGAAGAA
GCAGAAGAAGAAGCTAACGAAGAGCAGATGCT (SEQ ID NO 16).**

하나 이상의 아미노산 잔기의 종류 또는 위치는 단백질에 대해 특정화된 모든 잔기보다 적게 함유하는 삭제물, 특정화된 하나 이상의 잔기가 다른 잔기로 대체된 치환물, 및 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 말단 또는 중심 위치에 부가된 부가물과 같은 변형물을 포함하도록 변화되거나 변형된다(도 2 참조). 이러한 분자에는 다음이 포함된다: 선택된 포유동물이외의 숙주에 의해 발현되는 "바람직한" 코돈의 도입, 제한 엔도뉴클레아제 효소에 의한 절단용 위치의 제공 및 용이하게 발현되는 벡터의 구성을 돕는 추가의 개시, 말단 또는 중간 DNA 서열의 제공. 구체적으로, 혈청형 4의 아미노산 치환의 예는 다음과 같으나, 이에 제한되지 않는다: 위치 154의 E는 K로 치환됨; 위치 155의 P는 L로 치환됨; 위치 156의 G는 E로 치환됨; 위치 157의 E는 K로 치환됨; 위치 181의 K는 E로 치환됨; 위치 182의 D는 A로 치환됨; 위치 187의 R은 Y, H 또는 L로 치환됨; 위치 194의 I는 N으로 치환됨; 위치 200의 E는 D로 치환됨; 위치 202의 E는 D로 치환됨; 위치 209의 E는 K로 치환됨; 위치 212의 K는 E로 치환됨; 위치 218의 V는 L로 치환됨; 위치 220의 V는 K 또는 E로 치환됨; 위치 221의 K는 E로 치환됨; 위치 223의 N은 D 또는 K로 치환됨; 위치 225의 P는 S, T 또는 R로 치환됨; 위치 227의 D는 N으로 치환됨; 위치 228의 E는 K로 치환됨; 위치 229의 Q는 E, G 또는 D로 치환됨; 위치 230의 K는 T로 치환됨; 위치 232의 K는 N으로 치환됨; 위치 235의 E는 K로 치환됨; 위치 236의 A는 E로 치환됨; 위치 237의 E는 K로 치환됨; 위치 240의 S는 N으로 치환됨; 위치 241의 K는 E로 치환됨; 위치 242의 Q는 K로 치환됨; 위치 249의 K는 E로 치환됨; 위치 250의 K는 N으로 치환됨; 위치 257의 E는 Q 또는 K로 치환됨; 위치 263의 A는 L로 치환됨; 위치 264의 K는 E로 치환됨; 위치 265의 R은 N으로 치환됨; 위치 266의 R은 I로 치환됨; 위치 267의 A는 K 또는 V로 치환됨; 위치 258의 D는 T로 치환됨; 위치 269의 A는 D로 치환됨; 위치 291의 A는 T, V, P, G 또는 X로 치환됨; 위치 294의 G는 G, A 또는 E로 치환됨; 위치 295의 V는 D 또는 A로 치환됨; 위치 295의 P는 L 또는 F로 치환됨; 위치 299의 L은 P 또는 Q로 치환됨; 위치 328의 P는 S로 치환됨; 위치 329의 E는 G로 치환됨; 위치 340의 E는 A로 치환됨; 위치 343의 K는 E 또는 D로 치환됨; 위치 347의 E는 K로 치환됨; 위치 349의 D는 A로 치환됨; 위치 354의 R은 H로 치환됨; 위치 366의 E는 D로 치환됨; 위치 375의 E는 K로 치환됨; 위치 378의 K는 E로 치환됨; 위치 390의 E는 G로 치환됨; 위치 391의 P는 S로 치환됨; 위치 393의 N은 D로 치환됨; 위치 397의 V는 I로 치환됨; 및 위치 408의 K는 Q로 치환됨.

"폴리펩티드 R2 혈청형-R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절단형의 위치 16 내지 위치 444의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL
NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVK
EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKRKADAKLK
EANVATSDQGPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK
SGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDELEAESDVKVKE
AELELVKEEAKPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEEAKR
KAAEEDKVKEKPA (SEQ ID NO 7)**

폴리펩티드 R2 혈청형 R6x를 코드화하는 DNA 서열은 다음과 같다:

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAAA
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
 CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTA AACGAAGTATTTGCGTGAATTAA
 ATGTTTTAGAAGAGAAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAAGCA
 AAGTTAGACGCAGCTTTTGAGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTA ACTACCCAACCAATACTTA
 CAAAACGCTTGA ACTTGAAATTGCTGAGTTGATGTGAAAGTTAAAGAAG
 CGGAGCTTGA ACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAAICTCGAAACGAGGGC
 ACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTA
 CAAGGTTAGAAAACAICAAAGACAGAICTGTA AAAAAGCAGAAGAAGAAGCT
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCAG
 AICAAGGTAAACCAAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTA
 GCAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGT
 AGGTGAAGAACTCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAAGGTAG
 CAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCA
 AAAAGAAGAAGATCGCCGTA ACTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTG
 ACCTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAGTTAAAGAAGCGGAGCTTGAA
 CTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAAATTAAGC
 AAGCAAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGA
 AAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAA
 GCAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTG (SEQ ID NO 17)

혈청형 R6x의 CbpA의 아미노산 서열:

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL
NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVK
EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEAKRKADAKLK
EANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSSSLK
SGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTLDEIAESDVKVKE
AELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEAKR
KAAEEDKVKEKPAEQPPAPATQPEKPAPKPEKPAEQPKAEKTDDQQAEEY
ARRSEEEYNRLTQQPPKTEKPAQPSTPKTGWKQENGMWYFYNTDGSMAT
GWLQNNGSWYYLNANGAMATGWLQNNGSWYYLNANGSMATGWLQNNG
SWYYLNANGAMATGWLQYNGSWYYLNSNGAMATGWLQYNGSWYYLNA
NGDMATGWLQNNGSWYYLNANGDMATGWLQYNGSWYYLNANGDMATG
WVKDGDWYYLEASGAMKASQWFKVSDKWYYVNGSGALAVNTTVDGYG
VNANGWVN (SEQ ID NO 8).

혈청형 R6x의 CbpA의 아미노산 서열을 암호화하는 DNA 서열

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAAA
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
 CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTAACGAAGTATTTGCGTGAATTAA
 ATGTTTTAGAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAAGCA
 AAGTTAGACGCAGCTTTTGAGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTAACCTACCCAACCAATACTTA
 CAAAACGCTTGAACCTGAAATTGCTGAGTTTCGATGTGAAAGTTAAAGAAG
 CGGAGCTTGAACCTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAACTCGAAACGAGGGC
 ACAATTAAGCAAGCAAAGAGAAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTA
 CAAGGTTAGAAAACAACAAGACAGAACTGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCT
 AAACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTCAGA
 TCAAGGTAAACCAAAGGGGCGGGCAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGCTAG
 CAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGCGTA
 GGTGAAGAACTCTTCCAAGCTCATCCCTGAAATCAGGAAAAAAGGTAGC
 AGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTGAGAAAAAAGCCAAGGATCAA
 AAAGAAGAAGATCGCCGTAACCTACCCAACCAATACTTACAAAACGCTTGA
 CCTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAGTTAAAGAAGCGGAGCTTGAAC
 TAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCGAGACGAGGAAAAAATTAAGCA
 AGCAAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCTACAAGGTTAGAA
 AACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAGCTAAACGAAAAG
 CAGCAGAAGAAGATAAAGTTAAAGAAAAACCAGCTGAACAACCACAACC
 AGCGCCGGCTACTCAACCAGAAAAACCAGCTCCAAAACCAGAGAAGCCA
 GCTGAACAACCAAAAAGCAGAAAAAACAGATGATCAACAAGCTGAAGAAG
 ACTATGCTCGTAGATCAGAAGAAGAATATAATCGCTTGAACCAACAGCAA

CCGCCAAAACTGAAAAACCAGCACAACCATCTACTCCAAAAACAGGCT
 GGAAACAAGAAAACGGTATGTGGTACTTCTACAATACTGATGGTTCAATG
 GCAACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTATCTAAACGCTAA
 TGGTGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTCATGGTACTATC
 TAAACGCTAATGGTTCATGGCAACAGGATGGCTCCAAAACAATGGTTC
 TGGTACTACCTAAACGCTAATGGTGCTATGGCGACAGGATGGCTCCAATA
 CAATGGTTCATGGTACTACCTAAACAGCAATGGCGCTATGGCGACAGGAT
 GGCTCCAATACAATGGCTCATGGTACTACCTAACGCTAATGGTGATATG
 GCGACAGGATGGCTCCAAAACAACGGTTCATGGTACTACCTAACGCTAA
 TGGTGATATGGCGACAGGATGGCTCCAATACAACGGTTCATGGTATTACC
 TCAACGCTAATGGTGATATGGCGACAGGTTGGGTGAAAGATGGAGATACC
 TGGTACTATCTTGAAGCATCAGGTGCTATGAAAGCAAGCCAATGGTTCAA
 AGTATCAGATAAATGGTACTATGTCAATGGCTCAGGTGCCCTTGCAGTCA
 ACACA ACTGTAGATGGCTATGGAGTCAATGCCAATGGTGAATGGGTAAAC
 TAA (SEO ID NO 18).

"폴리펩티드 R1 혈청형 R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 R6x의 N-말단 절단형의 위치 16 내지 위치 321의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

ENEGSTQAATSSNMAKTEHRKAAKQVVDEYIEKMLREIQLDRRKHTQNVAL
 NIKLSAIKTKYLRELVLEEKSKDELPSSEIKAKLDAAFEKFKKDTLKPGEKVA
 EAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVK
 EEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKAETRLENIKTDRKKAEEEAKRKADAKLK
 EANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETL (SEQ ID
 NO 9).

폴리펩티드 R1을 암호화하는 DNA 서열:

GAAAACGAAGGAAGTACCCAAGCAGCCACTTCTTCTAATATGGCAAAGAC
 AGAACATAGGAAAGCTGCTAAACAAGTCGTCGATGAATATATAGAAAA
 ATGTTGAGGGAGATTCAACTAGATAGAAGAAAACATACCCAAAATGTCGC
 CTTAAACATAAAGTTGAGCGCAATTA AACGAAGTATTTGCGTGAATTAA
 ATGTTTTAGAAGAGAAGTCGAAAGATGAGTTGCCGTCAGAAATAAAAGCA
 AAGTTAGACGCAGCTTTTGAGAAGTTTAAAAAAGATACATTGAAACCAGG
 AGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGAAAAAA
 GCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTA ACTACCCAACCAATACTTA
 CAAAACGCTTGA ACTTGAAATTGCTGAGTTCGATGTGAAAGTTAAAGAAG
 CGGAGCTTGA ACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAGAATCTCGAAACGAGGG
 CACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTGAGGCT
 ACAAGGTTAGAAAACA CAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGAAGAAG
 CTA AACGAAAAGCAGATGCTAAGTTGAAGGAAGCTAATGTAGCGACTTCA
 GATCAAGGTA AACCAAAGGGGCGGGCAAAACGAGGAGTTCCTGGAGAGC
 TAGCAACACCTGATAAAAAAGAAAATGATGCGAAGTCTTCAGATTCTAGC
 GTAGGTGAAGAACTCTTC (SEQ ID NO 19).

"폴리펩티드 C/R2 혈청형 R6x"는 서열이 다음과 같은 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 타입 R6x의 N-말단 절단형의 위치 327 내지 위치 433의 아미노산 서열을 포함하는 반복 영역 C를 포함하는 폴리펩티드를 의미한다.

**KSGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTL DLEIAESDVKVK
 EAELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKA EATRLENIKTDRKKA EEEAK
 RKA (SEQ ID NO 10)**

폴리펩티드 C/R2 혈청형 R6x의 DNA 서열:

AAATCAGGAAAAAAGGTAGCAGAAGCTGAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTG
 AGAAAAAAGCCAAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGCCGTA ACTACCCAAC
 CAATACTTACAAAACGCTTGACCTTGAAATTGCTGAGTCCGATGTGAAAG
 TTAAGAAGCGGAGCTTGA ACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAGGAACCTCG
 AGACGAGGAAAAAATTAAGCAAGCAAAAAGCGAAAGTTGAGAGTAAAAAA
 GCTGAGGCTACAAGGTTAGAAAACATCAAGACAGATCGTAAAAAAGCAG
 AAGAAGAAGCTAACGAAAAGCA (SEQ ID NO 20).

"폴리펩티드 A/R2 혈청형 R6x"는 R2 내에 반복 영역 A를 포함하는 폴리펩티드를 의미하고(도2 참조), 여기서 반복 영역 A는 다음 서열을 갖는 콜린 결합 단백질 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단의 위치 155 내지 위치 265의 아미노산 서열을 갖는다:

**PGEKVAEAKKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTL ELEIAEFDVKVKE
 AELELVKEEAKESRNEGTIKQAKEKVESKKA EATRLENIKTDRKKA EEEAKR
 KADA (SEQ ID NO 11)**

폴리펩티드 A/R2 혈청형 R6x를 암호화하는 DNA 서열은

**CCAGGAGAAAAGGTAGCAGAAGCTAAGAAGAAGGTTGAAGAAGCTAAGA
AAAAAGCCGAGGATCAAAAAGAAGAAGATCGTCGTA ACTACCCAACCAA
TACTTACAAAACGCTTGA ACTTGA AATTGCTGAGTTCGATGTGAAAGTTA
AAGAAGCGGAGCTTGA ACTAGTAAAAGAGGAAGCTAAAAGAACTCGAAAC
GAGGGCACAATTAAGCAAGCAAAAAGAGAAAGTTGAGAGTAAAAAAGCTG
AGGCTACAAGGTTAGAAAACA CAAGACAGATCGTAAAAAAGCAGAAGA
AGAAGCTAAACGAAAAGCAGATGCT (SEQ ID NO 21).**

이다.

본 발명은 분리된(isolated) 폴리펩티드에 관련되고, 여기서 분리된 폴리펩티드는 단편, 돌연변이, 변이체, 유사체 또는 이의 유도체를 포함하는, SEQ ID NOS 22 또는 23에 제시된 것과 같은 아미노산 서열로 이루어진다.

**SPSLKPEKKVAEAEKKVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAESDV
EVKKAELVKEEAKEPRNEEKVKQAKAEVESKKAEATRLEKIKTDRKKAEE
EAKRKAEEEDKVKEKPA (SEQ ID NO 22; serotype 4; position 323-434); or
PSSSLKSGKKVAEAEKKVEEAEKKAKDQKEEDRRNYPTNTYKTL DLEIAESD
VKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKIKQAKAKVESKKAEATRLENIKTDRKKAEE
EEAKRKAEEEDKVKEKRA (SEQ ID NO 23, serotype R6x; position 322-434).**

"폴리펩티드 B/R2"는 도2에 제시된 것과 같은 콜린 결합 프로테인 A(CbpA) 혈청형 유형4의 N-말단 절단물의 위치 270 내지 위치 326의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. "폴리펩티드 B/R2 혈청형-R6x"는 도2에 제시된 것과 같은 콜린 결합 프로테인 A(CbpA) 혈청형 R6x의 N-말단 절단물의 위치 264 내지 위치 326의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 의미한다. 본 발명은 도1에 보여진 것과 같은 영역 A, B, C, A+B, B+C, A+C의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 주목한다.

또한, 본 발명은 N-말단 콜린 결합 프로테인 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 아미노산 KXXE(SEQ ID NO 6)를 갖는다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 프로테인 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 관련되고, 아미노산 서열이 도2에 제시된다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 도2에 제시된 것과 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다. 예를 들면, 보존된 영역(conserved region)은 아미노산 서열 158 내지 172, 300 내지 321, 331 내지 339, 355 내지 365, 367 내지 374, 379 내지 389, 409 내지 427 및 430 내지 447을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 도2는 본 발명에서 주목하는 CbpA의 N-말단 영역의 핵산과 아미노산 서열의 다양한 혈청형의 상동체(homology)를 제시한다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 프로테인 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 폴리펩티드는 렉틴 활성을 가지고 콜린에 결합하지 않는다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 단편, 돌연 변이, 변이체, 유사체 또는 이의 유도체를 포함하는 SEQ IN NO 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는다.

여기서 사용된 용어 "렉틴 활성을 갖는 폴리펩티드"는 탄수화물에 비공유결합하는 폴리펩티드, 펩티드 또는 단백질을 의미한다. 여기서 정의된 "부착"은 세척을 견디기에 충분히 안정한 박테리아의 인간 세포 또는 분비에의 비공유 결합을 의미한다. 여기서 정의된 "LNnT에 결합"은 알부민-조절보다 락토(Lacto)-N-테트라오세(neotetraose)로 피복된 기질에 더 잘 결합하는 것을 의미한다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 프로테인 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 면역원성 폴리펩티드를 제공한다. 면역원성 폴리펩티드는 단편, 돌연변이, 변이체, 유사체 또는 이의 유도체를 포함하는 SEQ IN NOS 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11에 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 갖는 것으로 본 발명에 의해 생각된다. 본 발명은 도2에 제시된 것과 같은 N-말단 콜린 결합 프로테인 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드를 제공한다. 한 양태에서, 폴리펩티드는 도2에 제시된 것과 같은 보존된 영역인 아미노산 서열을 갖는다.

본 발명은 앞에서 제시된 것과 같은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 유사체에 관련된다. 유사체 폴리펩티드는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 N 또는 COOH 말단에 임의로 부착된 N-말단 메티오닌 또는 N-말단 폴리히스티딘을 갖는다.

다른 양태에서, 본 발명은 폴리펩티드의 단백질 분해 소화 생성물을 낳는 폴리펩티드의 펩티드 단편을 주목한다. 다른 양태에서, 폴리펩티드의 유도체는 거기에 부착된 하나 이상의 화학적 부분을 가진다. 다른 양태에서, 화학적 부분은 수용성 중합체이다. 다른 양태에서, 화학적 부분은 폴리에틸렌 글리콜이다. 다른 양태에서, 화학적 부분은 모노-, 디-, 트리- 또는 테트라펩틸화(tetrapegylated)된다. 다른 양태에서, 화

학적 부분은 N-말단 모노퍼질화된다.

화합물에 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 부착은 PEG가 포유류에서 매우 독성이 낮기 때문에 특히 유용하다 (Carpenter et al., 1971). 예를 들면, 아데노신 디아미나제의 PEG 부가체는 심한 복합 면역결핍증의 치료제로서 인간에 사용되기 위해 미국에서 승인되었다. PEG 결합에 의해 수득된 두번째 이점은 이중 화합물의 면역원성과 항원성을 효과적으로 감소시키는 것이다. 예를 들면, 인간 프로테인의 PEG 부가체는 심한 면역 반응을 일으킬 위험 없이 다른 포유종에서 질병 치료제로서 유용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 화합물에 대한 또는 화합물을 생산할 수 있는 세포에 대한 숙주 면역 반응을 감소시키거나 방지하기 위해 미소캡슐화 장치에 운반될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 막에 미소캡슐화되어(예를 들면, 리포솜) 운반될 수 있다.

프로테인과 직접 반응하기에 적절한 PEG의 많은 활성 형태가 기술되었다. 프로테인 아미노 그룹과의 반응을 위해 유용한 PEG 제제는 카복실산의 활성 에스테르나 탄산염 유도체를 포함하고, 특히 이탈기가 N-하이드록시석신아이드, p-니트로페놀, 이미다졸 또는 1-하이드록시-2-니트로벤젠-4-설포네이트인 것들이다. 말레이미도 또는 할로아세틸 그룹을 함유하는 PEG 유도체가 프로테인 유리 설피하이드릴 그룹을 변형시키기 위해 유용한 제제이다. 유사하게, 아미노 히드라진이나 히드라지드 그룹을 함유하는 PEG 제제는 단백질의 탄수화물 그룹의 과옥소산염 산화(periodate oxidation)에 의해 생성된 알데하이드와의 반응에 유용하다.

한 양태에서, 여기서 기술된 폴리펩티드의 아미노산 잔기는 "L" 이성질형이 바람직하다. 다른 양태에서, "D" 이성질형의 잔기는 렉틴 활성의 원하는 작용성이 폴리펩티드에 의해 보유되는 한, 특정 L-아미노산 잔기를 대신할 수 있다. NH₂는 폴리펩티드의 아미노 말단에 존재하는 유리 아미노 그룹을 나타낸다. COOH는 폴리펩티드의 카복시 말단에 존재하는 유리 카복시 그룹을 나타낸다. 여기서 사용된 축약형은 표준 폴리펩티드 명명을 따르고 있다[J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969)].

모든 아미노산 잔기 서열은 왼쪽 및 오른쪽 방향이 아미노 말단에서 카복시 말단의 통상적인 방향인 식에 의해 여기서 표시된다는 것을 주목해야 한다. 나아가, 아미노산 잔기 서열의 처음 또는 끝에서 '-' (dash)는 펩티드가 하나 이상의 아미노산 잔기의 다른 서열에 결합함을 나타낸다.

고상, 액상 또는 펩티드 응축 기술 또는 이의 혼합의 공지된 방법을 사용하여 제조된 합성 폴리펩티드는 천연 또는 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드 합성을 위해 사용된 아미노산은 Merrifield(1963, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)의 원래 고체상 방법의 표준 탈보호, 중화, 커플링 및 세척 프로토콜을 가진 표준 Boc(N^α-아미노 보호된 N^α-t-부틸옥시카보닐)아미노산 수지이거나, Carpino 및 Han(1972, J. Org. Chem., 37:3403-3409)에 첫번째 기술된 염기-불안정한 N^α-아미노 보호된 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 아미노산이다. 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 특별한 성질을 운반하는 D-아미노산, D- 및 L-아미노산의 혼합 및 다양한 "디자인" 아미노산(예를 들면, β-메틸아미노산, Cα-메틸아미노산 및 Nα-메틸아미노산 등)을 포함할 수 있다. 합성 아미노산은 라이신용 오르니틴, 페닐알라닌용 플루오로페닐알라닌 및 루신이나 이소루신용 노르루신을 포함한다. 또한, 특정 커플링 단계에 특정 아미노산을 놓음으로써, α-헬릭스, β-턴, β-판(sheet), γ-턴(turn) 및 사이클릭 펩티드가 생성될 수 있다.

본 발명의 하나의 일면에서, 펩티드는 CO₂H 또는 CONH₂ 결사슬을 삽입하는 유리 글리신 또는 글리신 아미드기를 모의하는 특별한 아미노산을 C-말단에 포함할 수 있다. 비드에 대한 결합 또는 링커(linker)로 이루어진 결사슬이 있는 D 아미노산 유사체 또는 L 아미노산 유사체 또한 이러한 특별한 잔기로 볼 수 있다. 하나의 예에서, 유사-유리 C-말단 잔기는 D 또는 L 광학 배열이며, 다른 예에서는 D 및 L- 이성질체의 라세믹 혼합물을 사용할 수 있다.

또다른 예에서는 피로글루타메이트가 펩티드의 N-말단 잔기로 포함될 수 있다. N-말단 피로글루타메이트로 주어진 비드상에 펩티드의 단지 50%만이 치환되도록 한정함으로써 피로글루타메이트가 에드만 변형(Edman degradation)에 의한 서열을 따를 수는 없지만, 서열화를 위한 비드상에는 충분한 비-피로글루타메이트 펩티드가 남아있을 것이다. 당업자라면 이러한 기술이 N-말단에서 에드만 변형에 따르지 않는 잔기를 삽입하는 펩티드의 서열화를 위하여 사용될 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다. 원하는 활성을 나타내는 개개의 펩티드를 특성화하는 다른 방법은 아래에서 상세하게 기술한다. 블록된 N-말단기, 예를 들면, 피로글루타메이트를 포함하는 펩티드의 특이 활성은, 특정 N-말단기가 펩티드의 50% 내에서 존재하는 경우, 완전 블록된 펩티드(100%)를 블록되지 않은 펩티드(0%)와 비교함으로써 용이하게 나타낼 수 있다.

또한, 본 발명은 보다 명백하게 특정된 구조적 특성을 갖는 펩티드를 제조하고, 신규의 특성을 갖는 펩티드를 제조하기 위하여 펩티드 모방체, 에스테르 결합과 같은 펩티드 모방결합을 사용하려는 것이다. 다른 예에서, 펩티드는 환원된 펩티드 결합, 즉, R₁-CH₂-NH-R₂ (여기서, R₁ 및 R₂는 아미노산 잔기 또는 서열이다)을 삽입하여 펩티드를 발생시킬 수 있다. 환원 펩티드는 디펩티드 서브유닛으로 도입될 수 있다. 이러한 분자는 펩티드 결합의 가수분해, 예를 들면 프로테아제 활성에 대한 내성을 갖는다. 이 펩티드는 신진대사의 파괴 또는 프로테아제 활성에 대한 내성으로 인하여, 생체내에서의 반감기를 연장시키는 등의 특별한 기능 및 활성을 리간드에 부여한다. 더욱이, 특정한 시스템에서는 억제 펩티드가 구조활성이 증가된다는 것이 잘 알려져 있다.(문헌[Hurby, 1982, Life Sciences 31:189-199; Hruby et al., 1990, Biochem J. 268:249-262]참조) 본 발명은 모든 가능한 위치에 랜덤한 서열을 삽입하는 억제 펩티드를 생성하는 방법을 제공한다.

억제된, 고리화 펩티드 또는 경직화 펩티드(regidized peptide)는, 아미노산 또는 아미노산 유사체가 펩티드의 서열 중 둘 이상의 위치에서 삽입되어 처리후 가교 결합을 형성함으로써 펩티드의 고리화 또는 경직화를 제한하도록 가교화할 수 있는 화학작용기를 제공하는 한, 합성에 의하여 제조될 수 있다. 회전에 의하여 유도된 아미노산이 삽입되는 경우 고리화가 바람직할 것이다. 펩티드를 가교결합할 수 있는 아미노산의 예로는 디설파이드 결합을 형성하는 시스테인, 락톤 또는 락타아제를 형성하는 아스파라긴산과 전이 금속을 킬레이트하여 가교결합을 형성하는 γ-카르복실-글루타민산(Gla)(Bachem)과 같은 킬레이트를 들 수 있다. 보호된 γ-카르복실-글루타민산은 지칭과 올손(문헌[1980, Biophys. Biochem. Res. Commun. 94:1128-1132]참조)에 의하여 기술된 합성을 변형하여 제조할 수 있다. 그 펩티드 서열이 적어도 두 개

이상의 가교결합할 수 있는 아미노산을 포함하는 펩티드는 예를 들면 시스테인 잔기를 산화하여 디설파이드를 형성하거나 또는 금속이온을 첨가하여 칼레이트를 형성하여 처리할 수 있으며, 그 결과 펩티드를 가교하여 억제된, 고리형 또는 경직형 펩티드를 형성한다.

본 발명은 가교결합을 구조적으로 만들 수 있는 방법을 제공한다. 예를 들면, 4개의 시스테인 잔기가 펩티드 서열에 삽입되는 경우 상이한 보호기를 사용할 수 있다. (문헌[Hiskey, 1981, in *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 3, Gross and Meienhofer, eds., Academic Press: New York, pp. 137-167; Ponsanti et al., 1990, *Tetrahedron* 46:8255-8266]) 참조) 시스테인의 첫번째 쌍은 탈보호되고 산화될 수 있으며, 다음 두번째 세트가 탈보호 및 산화될 수 있다. 이러한 방식으로 특정의 디설파이드 가교결합이 형성될 수 있다. 선택적으로는 시스테인 한쌍과 콜라팅 아미노산 유사체 한쌍이 삽입되어 가교결합은 상이한 화학적 성질을 가질 수 있다.

다음의 비-고전적인 아미노산이 특별한 형태적인 모티브를 제공하기 위하여 펩티드에 삽입될 수 있다: 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실레이트(문헌[Kazmierski et al., 1991, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2275-2283] 참조); (2S,3S)-메틸-페닐알라닌, (2S,3R)-메틸-페닐알라닌, (2R,3S)-메틸-페닐알라닌 및 (2R,3R)-메틸-페닐알라닌(문헌[Kazmierski and Hruby, 1991, *Tetrahedron Lett.*] 참조); 2-아미노테트라하이드론나프탈렌-2-카르복실산(문헌[Landis, 1989, Ph.D. "Thesis, University of Arizona"] 참조); 하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실레이트(문헌[Miyake et al., 1989, *J. Takeda Res. Labs.* 43:53-76] 참조); β -카볼린(D 및 L)(문헌[Kazmierski, 1988, Ph.D. Thesis, University of Arizona] 참조); HIC(히스티딘 이소퀴놀린 카르복실산)(문헌[Zechel et al., 1991, *Int. J. Pep. Protein Res.* 43] 참조) 및 HIC(히스티딘 사이클릭 우레아)(Dharanipragada).

후술하는 아미노산 유사체 및 펩티드 모방체는 펩티드에 삽입되어 특정의 2차 구조를 유도하거나 보조할 수 있다: LL-Acp(LL-3-아미노-2-프로페니돈-6-카르복실산); β -회전 유도 디펩티드 유사체(문헌[Kemp et al., 1985, *J. Org. Chem.* 50:5834-5838] 참조); β -시트 유도 유사체(문헌[Kemp et al., 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:5081-5082] 참조); β -회전 유도 유사체(문헌[Kemp et al., 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:5057-5060] 참조); 헬릭스 유도 유사체(문헌[Kemp et al., 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:4935-4938] 참조); γ -회전 유도 유사체(문헌[Kemp et al., 1989, *J. Org. Chem.* 54:109:115] 참조) 및 하기 문헌에서 제공된 유사체들(문헌[Nagai and Sato, 1985, *Tetrahedron Lett.* 26:647-650; DiMaio et al., 1989, *J. Chem. Soc. Perkin trans.* p.1687] 참조); Gly-Ala-회전 유사체(문헌[Kahn et al., 1989, *Tetrahedron Lett.* 30:2317] 참조); 아미드 결합 동소체(문헌[Jones et al., 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:3853-3856] 참조); 트레트라졸(문헌[Zabrocki et al., 1988, *J. Am. Chem. Soc.* 110:5857-5880] 참조); DTC(문헌[Samanen et al., 1990, *Int. J. Protein Pep. Res.* 35:501:509] 참조); 및 울손등의 문헌[1990, *J. Am. Chem. Sci.* 112:323-333 and Garvey et al., 1990, *J. Org. Chem.* 56:436]에 개시된 유사체. 형태가 한정된 베타회전 및 베타 벌즈의 모방체 및 이들을 함유하는 펩티드는 1995년 8월 8일자로 칸 등에 의하여 특허된 미국특허 제5,440,013에 개시되었다.

본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드 또는 펩티드의 변형 또는 파생물을 제공한다. 펩티드의 변형은 당업자에게 잘 알려져 있으며 포스포릴레이션, 카르복시메틸화 및 아실화 등을 들 수 있다. 변형은 화학적 또는 효소적 수단에 의하여 영향을 받을 수 있다. 다른 일면으로 글리코실화되거나 지방산 아실화된 펩티드 유도체가 제조될 수 있다. 글리코실화되거나 지방산 아실화된 펩티드의 제법은 당업계에 잘 알려져 있다. 지방산 아실 펩티드 유도체 또한 제조될 수 있다. 예를 들면, 제한 없이, 유리 아미노기(N-말단 또는 리실)는 아실화, 예를 들면 미리스토일레이트될 수 있다. 다른 예로는 구조가 $(CH_2)_nCH_3$ 인 지방산의 결사슬을 포함하는 아미노산은 펩티드에 삽입될 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 이 펩티드 지방산 콘주게이트 및 기타 펩티드 지방산 콘주게이트는 영국특허 제8809162.4, 국제특허출원 PCT/AU89/00166 및 상기 참고문헌5에 기재되어 있다.

폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 돌연변이가 만들어져 특정 코돈을 다른 아미노산을 코딩하는 코돈으로 변화시킬 수 있다. 이러한 돌연변이는 일반적으로 거의 뉴클레오티드의 변화가 없도록 하여 만들어진다. 이러한 부류의 돌연변이의 치환은 생성되는 단백질에서 아미노산이 비 보존적 방식(즉, 특정의 크기와 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴)에 의하여, 또는 보존적 방식(즉, 특정의 크기와 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산으로부터 같은 그룹에 속하는 아미노산으로 코돈을 변화시킴)에 의하여 변화되도록 할 수 있다. 그러한 보존적 변화는 일반적으로 생성되는 단백질을 구조 및 기능면에서 덜 변화하도록 한다. 비 보존적 변화는 생성되는 단백질의 구조, 활성 또는 기능을 보다 변화시킨다. 본 발명은 생성되는 단백질의 결합 특성 또는 활성을 현저하게 변화시키지 않는 보존적 변화를 함유하는 서열을 포함하도록 고려되어야 한다. 서열내에서 아미노산 대용의 치환체는 다른 류에서부터 아미노산이 속하는 류 중에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 비극성(소수성) 아미노산에는 알라닌, 루신, 이소루신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌 등이 포함된다. 방향족 환을 갖는 아미노산으로는 페닐알라닌, 트립토판 및 트립신에 있다. 극성 천연 아미노산으로는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민에 있다. 양전하성(염기성)아미노산으로는 아르기니, 리신 및 히스티딘등이 포함된다. 음전하성(산성) 아미노산으로는 아스파라긴 산 및 글루타민 산 등이 포함된다. 그러한 변형은 폴리아크릴아미드 겔 전기영동법 또는 등전위점법에 의하여 측정되는 명백한 분자량에 영향을 끼치지 않을 것으로 생각된다.

특히 바람직한 치환체는:

Arg를 치환하는 Lys, 즉 양전하가 유지될 수 있는 치환체;

Asp를 치환하는 Glu, 즉 음전하가 유지될 수 있는 치환체;

Thr를 치환하는 Ser, 유리 -OH가 유지될 수 있는 치환체;

Asn를 치환하는 Gln, 유리 NH_2 가 유지될 수 있는 치환체

이다.

합성 DNA 서열은 동종 또는 "뮤테인(mutein)"을 나타내는 종을 편리하게 만들 수 있도록 한다. 비천연 아미노산을 단백질에 위치 특이적으로 삽입하는 일반적인 방법은 문헌[Noren, et al. Science, 244: 182-188(April 1989)]에 기재되어 있다. 이 방법은 비천연 아미노산의 유사체를 만들기 위하여 사용될 수 있다.

본 발명에 따르면, 당업계내에서의 통상의 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술을 사용할 수 있다. 이러한 기술은 문헌에 자세하게 기재되어 있다. (문헌[Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R.M. ed. (1994); "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III J.E. Celis, ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I- III Coligan, J.e., ed.(1994); "Oligonucleotide Synthesis" M.J. Gait ed. 1984; "Nucleic Acid Hybridization" B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985); "Transcription And Translation" B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984); "Animal Cell Culture" R.I. Frenshney, ed. (1986); "Immobilized Cells And Enzymes" IRL Press, (1986); B.Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)] 참조)

추가 양태에 있어서, 피로글루타메이트는 펩티드의 N-말단 잔기로서 포함될 수 있다. 피로글루타메이트가 N-말단 피로글루타메이트를 갖는 주어진 비드에서 단지 펩티드 50%만으로 치환시켜 제한함으로써 에드만 분해에 의해 연속할 수 없을지라도, 연속하기 위한 비드상에 충분한 비피로글루타메이트 펩티드가 잔류할 것이다. 이러한 기술을 사용하여 N-말단에서 에드만 분해에 대한 잔류 내성을 혼입하는 펩티드를 연속시키는 데 사용될 수 있음을 통상적인 숙련자들은 쉽게 일지할 것이다. 특정 N-말단 그룹이 펩티드의 50%내에 존재하는 경우, 블록화된 N-말단 그룹(예: 피로글루타메이트)을 포함하는 펩티드의 특정 활성화에 상세히 기재되어 있는, 목적하는 활성을 설명하는 각각의 펩티드를 특성화하기 위한 다른 방법은 비블록화된(0%) 펩티드를 갖는 완전히(100%) 블록화된 펩티드의 활성을 비교함으로써 쉽게 설명된다.

유도체화용 화학 잔기

유도체화용에 적합한 화학 잔기는 수용성 중합체중에서 선택될 수 있다. 선택된 중합체는 수용성이어서, 부착되는 성분은 수성 환경(예: 생리학적 환경)에서 침전되지 않는다. 바람직하게는, 말단 생성물 제조의 치료상 용도에 있어서, 중합체는 약제학적으로 허용될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련자들은 중합체/성분 공액이 치료학적으로 사용될 수 있고, 목적하는 투여량, 순환 시간, 단백질 가수분해에 대한 내성 및 기타 사항을 고려하여 목적하는 중합체를 선택할 수 있을 것이다. 당해 성분(들)에 있어서, 이들은 본원에 제공된 분석물을 사용하여 확인하게 될 것이다.

수용성 중합체는, 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레 무수물 공중합체, 폴리아미노산(단독중합체 또는 랜덤 공중합체) 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 프로일프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸레이트 폴리올 및 폴리비닐 알콜로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드는 수중에서의 안정성 때문에 제조시 이점을 가질 수 있다.

중합체는 특정 분자량일 수 있고, 측쇄이거나 비측쇄일 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜에 있어서, 바람직한 분자량은 약 2 내지 약 100kDa(용어 "약"은 폴리에틸렌 글리콜의 제조시 몇몇 분자량이 표준 분자량에 비해 좀 더 많거나, 좀 더 적음을 나타낸다)이다. 기타 크기는 목적하는 치료학적 프로파일(예: 목적하는 서방성 기간, 효과, 경우에 따라, 생물학적 활성, 취급 용이성, 항원성의 정도 또는 부족 및 치료학적 단백질류에 대한 기타 공지된 폴리에틸렌 글리콜의 효과)에 좌우되어 사용될 수 있다.

부착된 중합체 분자의 수는 변할 수 있고, 당해 기술분야의 숙련자들은 작용시 효과를 확신할 수 있을 것이다. 모노 유도체일 수 있거나, 디,트리, 테트라 또는 동일하거나 상이한 화학적 잔기(예: 상이한 중량의 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체)를 갖는 유도체의 배합물일 수 있다. 반응 혼합물에서 이들의 농도일 수 있기 때문에, 중합체 분자 대 성분 또는 성분 분자의 비율은 변할 수 있다. 일반적으로, 최적비(과량의 비반응 성분(들) 및 중합체가 존재하지 않는 반응의 효율에 있어서)는 목적하는 유도체화 정도(예: 모노, 디, 트리 등), 중합체가 측쇄거나 비측쇄인지 간에 선택된 중합체의 분자량 및 반응 조건과 같은 인자에 의해 측정될 것이다.

폴리에틸렌 글리콜 분자(또는 기타 화학 잔기)는 단백질의 작용 또는 항원 영역에서의 효과를 고려하여 성분(들)에 부착될 수 있다. 당해 기술분야의 숙련자들에게 유용한 다수의 부착 방법은, 예를 들면, 본원에 참조로 인용된 EP 제0 401 384호(PEG를 G-CSF에 커플링시킴), 말리크(Malik) 등의 문헌[참조: 1992, Exp. Hematol, 20:1028-1035](트리셀 클로라이드를 사용하는 GM-CSF의 폐길화를 보고함)에 있다. 예를 들면, 폴리에틸렌 글리콜은 반응성 그룹(예: 유리 아미노 또는 카복실 그룹)을 통해 아미노산 잔기를 통해 공유결합적으로 결합될 수 있다. 활성화된 폴리에틸렌 글리콜 분자인 반응성 그룹은 결합될 수 있다. 유리 아미노 그룹을 갖는 아미노산 잔기는 리신 잔기 및 말단 아미노산 잔기를 포함하고, 유리 카복실 그룹을 갖는 아미노산 잔기는 아스파르트산 잔기, 글루탐산 잔기 및 C-말단 아미노산 잔기를 포함한다. 또한, 설피드 그룹은 폴리에틸렌 글리콜 분자(들)를 부착시키기 위한 반응성 그룹으로서 사용될 수 있다. 치료학적 목적으로 바람직한 것은 N-말단 또는 리신 그룹에 부착시키는 것과 같이 아미노 그룹에서 부착시키는 것이다.

본 발명은 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단형의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 도 2에 나타난 바와 같이 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단형의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 제공한다. 하나의 양태에 있어서, 핵산은 단편, 돌연변이, 변이체, 유사체 또는 이의 유도체를 포함하는, SEQ ID NOS 12, 14-17 또는 19-21에서 이후 언급된다. 핵산은 DNA, cDNA, 게놈 DNA, RNA이다. 게다가, 분리된 핵산은 RNA 전사의 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 핵산이 핵틴 활성을 경쟁적으로 억제하는 사용된다고 여겨진다.

"벡터"는 부착된 단편의 복사를 발생시키기 위해 부착될 수 있는 또 다른 DNA 단편인 레플리콘(예: 플라스미드, 파지 또는 코스미드)이다.

"DNA"는 단일 꼬임 형태 또는 이중 꼬임 나선형에서 데옥시리보뉴클레오티드(아데닌, 구아닌, 티민 또는 사이토신)의 중합체 형태이다. 이러한 용어는 단지 분자의 제1 및 제2 구조만을 나타내고, 구체적인 3급 형태를 제한하지 않는다. 따라서, 이러한 용어는 밝혀진 이중 꼬임 DNA, 그 중에서도 선형 DNA 분자(예: 제한 단편), 바이러스, 플라스미드 및 염색체를 포함한다. 특정 이중 꼬임 DNA 분자의 구조를 토의할 때, 서열은 전사되지 않은 DNA 꼬임(즉, mRNA와 일치하는 서열을 갖는 꼬임)과 함께 5' 내지 3'방향에서 단지 서열만을 제공하는 표준 전달에 따라 본원에 기재될 수 있다.

DNA 서열은 표현 조절 서열을 조절하고 DNA 서열의 전사 및 번역을 조절하는 경우, 표현 조절 서열에 대해 "작동적으로 연결된다". "작동적으로 연결된"이라는 용어는 표현되는 DNA 서열의 앞에 적합한 출발 시그널(예: ATG)을 가지며, 표현 조절 서열의 조절하에 DNA 서열의 표현을 가능하게 하는 정확한 판독 프레임 및 DNA 서열에 의해 암호화된 목적하는 생성물의 생성물을 유지함을 나타낸다. 제조합형 DNA 분자 속으로 삽입시킴을 바라는 유전자가 적합한 출발 시그널을 포함하는 경우, 이러한 출발 시그널은 유전자의 앞에 삽입될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 기재한 핵산 분자를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 프로모터는 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유류 프로모터일 수 있거나, 이와 동일하다. 또한, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 효모 기술 염색체(YAC), 박테리오파지 또는 진핵세포 바이러스성 DNA일 수 있다.

표현 단백질에 유용한, 당해 기술분야에 공지된 기타 다수의 벡터 주쇄가 사용될 수 있다. 이러한 벡터로 아데노바이러스(AV), 아데노 관련된 바이러스(AAV), 시미안 바이러스 40(SA40), 시토메갈로바이러스(CMV), 마우스 유방암 바이러스(MMTV), 몰로니 쥐 백혈병 바이러스, DNA 운반 시스템, 즉 리포솜 및 표현 플라스미드 운반 시스템을 포함하지만, 이로써 한정되는 것은 아니다. 또한, 벡터의 하나의 부류는 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 간상체 바이러스, RNA 종양 바이러스 및 샘리키 삼림 바이러스를 포함한다. 이러한 벡터는 통상적으로 수득될 수 있거나 당해 기술분야에서 익히 공지된 방법에 의해 기재된 서열로부터 모을 수 있다.

또한, 본 발명은 적합한 숙주 세포의 벡터를 포함하는 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 벡터 시스템을 제공한다. 적합한 숙주 세포는 원시핵 세포 또는 성숙핵 세포, 예를 들면, 박테리아 세포(그램 양성 세포를 포함함), 효모 세포, 균류 세포, 곤충 세포 및 동물 세포를 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 다수의 포유류 세포는 마우스 섬유아 세포 NIH, 3T3, CHO 세포, HeLa 세포, Ltk 세포, Cos 세포 등을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다.

각종 숙주/표현 벡터 배합은 본 발명의 DNA 서열을 표현하는 데 사용될 수 있다. 유용한 표현 벡터는, 예를 들면, 염색체, 비염색체 및 합성 DNA 서열의 단편으로 이루어질 수 있다. 적합한 벡터는 SV40의 유도체 및 공지된 박테리아 플라스미드, 예를 들면, 이. 콜리(*E. coli*) 플라스미드 콜 EI, pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체, PR4와 같은 플라스미드; 파지 DNAs, 예를 들면, 파지 λ 의 다수의 유도체, 예를 들면, NM989 및 기타 파지 DNA, 예를 들면, M13 및 성질의 단일 꼬임 파지 DNA; 효모 플라스미드(2 μ 플라스미드) 또는 이들의 유도체; 성숙핵 세포에서 유용한 벡터(예: 곤충 또는 포유류 세포에서 유용한 벡터); 플라스미드와 파지 DNA의 조합으로부터 유도된 벡터(예: 파지 DNA 또는 기타 표현 조절 서열을 사용하기 위해 개질된 플라스미드) 등을 포함한다.

다양한 표현 조절 서열-이에 작동적으로 연결된 DNA 서열의 표현을 조절하는 서열-은 이러한 벡터에 사용되어 본 발명의 DNA 서열을 표현한다. 이러한 유용한 표현 조절 서열은, 예를 들면, SV40, CMV, 우두, 폴리노마 또는 아데노마 바이러스, 락(lac) 시스템, 트랩 시스템, TAC 시스템, TRC 시스템, LTR 시스템, 파지 λ 의 주 작동자 및 프로모터, fd 피복 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나아제 또는 기타 글리콜릭 효소용 프로모터, 산 포스페이트(예: Pho 5)의 프로모터, 효모 α -교배 인자의 프로모터 및 원시핵 세포 또는 성숙핵 세포 또는 이들의 바이러스의 표현을 조절하기 위해 공지된 기타 서열, 및 다양한 이들의 조합을 포함한다.

다양한 단세포 숙주 세포는 또한 본 발명의 DNA 서열을 표현하는데 유용하다. 이러한 숙주는 이 콜리, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스와 같은 익히 공지된 성숙핵 세포 및 원시핵 세포; 효모와 같은 진균; CHO, R1.1, B-W 및 L-W 세포와 같은 동물 세포; 아프리카 녹색 원숭이의 신장 세포(예: COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 및 BMT10), 곤충 세포(예: Sf9) 및 사람 세포 및 배양 조직중의 식물 세포를 포함한다.

모든 벡터, 표현 조절 서열 및 숙주는 본 발명의 DNA 서열을 표현하는 데 있어서 균일하게 잘 작용할 것으로 이해된다. 모든 숙주가 동일한 표현 시스템을 사용하여 균일하게 잘 작용하지는 않을 것이다. 그러나, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명의 범주를 벗어나지 않으면서 목적하는 표현을 성취하는데 부적당한 실험없이 적합한 벡터, 표현 조절 서열 및 숙주를 선택할 수 있을 것이다. 예를 들면, 벡터 선택시, 벡터가 숙주내에서 작용해야 하기 때문에, 반드시 고려되어야 한다. 벡터 복사 수, 수를 복사하는 것을 조절하는 능력 및 벡터에 의해 암호화된 기타 단백질의 표현(예: 항생제 표시)이 또한 고려될 것이다.

표현 조절 서열 선택시, 다양한 인자가 일반적으로 고려될 것이다. 이는, 예를 들면, 시스템의 상대적인 강도, 이의 제어력, 및 특정 DNA 서열을 갖는 이의 혼화성 또는 특히 유효한 제2 구조로 간주되는 표현되는 유전자를 포함한다. 적합한 단일 세포 숙주는, 예를 들면, 이들의 선택된 벡터와의 혼화성, 이들의 분비 특성, 단백질을 정확하게 접기 위한 능력, 이들의 발효 필요성 및 표현될 DNA 서열에 의해 암호화된 생성물의 숙주에 대한 독성, 및 표현 생성물의 정제의 용이성을 고려하여 선택될 것이다.

본 발명은 또한 폴리펩티드의 생성을 제한하고 이와 같이 제조된 폴리펩티드를 회소하는 적합한 조건하에, 상기 기재한 숙주 벡터 시스템을 성장시킴을 포함하는 폴리펩티드를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 분리된 폴리펩티드를 특별히 인지하거나 결합시킬 수 있는 항체를 제공한다. 항체는 단클론성 또는 다클론성일 수 있다. 또한, 항체는 화학적, 축색, 형광 또는 발광 표지인 검출 표지를 사용하여 라벨링할 수 있다. 라벨링된 항체는 다클론성 또는 단클론성 항체일 수 있다. 하나의 양태에 있어서, 라벨링된 항체는 정제된 라벨링된 항체이다. 라벨링 항체의 방법은 당해 기술분야에 익히 공지되어

있다.

용어 "항체"는, 예를 들면, 천연 발생 항체 및 천연적으로 발생하지 않는 항체를 둘 다 포함한다. 특히, 용어 "항체"는 다클론성 또는 단클론성 항체 및 이들의 분획을 포함한다. 또한, 용어 "항체"는 공상의 항체 및 전체적인 합성 항체, 및 이들의 분획을 포함한다. 이러한 항체는 다클론성, 단클론성, 공상의, 단일쇄, Fab 분획 및 Fab 표현 라이브러리를 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다.

당해 기술분야에 공지된 다양한 과정은 폴리펩티드에 대한 다클론성 항체 또는 이의 유도체 또는 유사체를 제조하는 데 사용될 수 있다[참조: 항체 - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Ne York, 1988]. 항체를 제조하기 위해, 래빗, 마우스, 랫, 양, 콜린 등을 포함하지만, 이로써 제한되지 않는 다양한 숙주 동물을 절단된 CbpA 또는 이들의 유도체 (예: 분획 또는 용해 단백질)를 사용하여 주사함으로써 면역시킬 수 있다. 하나의 양태에 있어서, 폴리펩티드는 면역원 담체, 예를 들면, 소 혈청 알부민(BSA) 또는 키홀 림펫 헤모시아닌(KLH)에 공역화될 수 있다. 다양한 보조제는 숙주 종류에 좌우되어 면역학 반응을 증가시키는 데 사용될 수 있다.

단클론성 항체, 분획, 유사체, 이들의 유도체를 제조하기 위해, 배양균에서 연속 세포주에 의해 항체 분자를 제조하기 위해 제공되는 기술이 사용될 수 있다[참조: 항체 - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Ne York, 1988]. 이는 원래 콜러(Kohler)와 밀스타인(Milstein)(참조: 1975, Nature 256: 495-497)에 의해 개발된 하이브리도마 기술, 트리오마 기술, 사람 B-세포 하이브리도마 기술[참조: Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72] 및 사람 단클론성 항체를 제조하기 위한 EBV-하이브리도마 기술[참조: Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96]을 포함하지만, 이로써 한정되지는 않는다. 본 발명의 부가의 양태에 있어서, 단클론성 항체는 최근 기술(PCT/US90/02545)을 사용하여 무균 동물에서 제조될 수 있다. 본 발명에 따라, 사람 항체가 사용될 수 있고, 사람 하이브리도마를 사용[참조: Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2026-2030]하거나, 시험관내 EBV 바이러스를 갖는 사람 B 세포를 변형[참조: Cole et al., 1985, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77-96]시킴으로써 수득할 수 있다. 실제로, 본 발명에 따라, 적절한 생물학적 활성의 사람 항체 분자로부터의 유전자와 함께 폴리펩티드에 대해 특이성인 마우스 항체 분자로부터의 유전자를 접합하여 "키메라 항체"의 제조를 위해 개발된 기술[참조: Morrison et al., 1984, J. Bacteriol. 159-870; Neuberger et al., 1984, Nature 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314: 452-454]이 사용될 수 있으며; 당해 항체는 본 발명의 범주내이다. 이러한 사람 또는 인간화된 키메라 항체는 사람 질병 또는 질환(아래에 기재되어 있음)을 치료하는 데 사용하기에 바람직한데, 이는 사람 또는 인간화된 항체가 면역 반응, 특히 알레르기성 반응 자체를 유도하기에는 이중 항체보다 덜 적합하기 때문이다. 본 발명의 또 다른 양태는 Fab 표현 문헌[참조: Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281]의 구조에 대해 기재되어 있는 기술을 이용하여 폴리펩티드 또는 이의 유도체 또는 유사체에 대한 바람직한 특이성과 단일 클론성 Fab 분절의 신속하고도 용이한 확인을 허용한다.

항체 분자의 개별 특이성을 포함하는 항체 분절은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들면, 이러한 분절은 다음을 포함하지만, 이로써 제한되는 것은 아니다: 항체 분자의 펩신 소화로 인해 제조될 수 있는 F(ab')₂ 분절; F(ab')₂ 분절의 이황화물 브릿지를 감소시킴으로써 생성될 수 있는 Fab' 분절, 및 항체 분자를 파파인 및 감소제로 처리함으로써 생성될 수 있는 Fab 분절.

항체의 제조에 있어서, 바람직한 항체에 대한 스크리닝은 당해 분야에서 공지된 기술[예: 방사선 면역 측정법, 엘라이자(ELISA)(효소 면역 측정법), "샌드위치" 면역 측정법, 면역 방사 측정법, 한천 확산 침강 반응, 면역 확산 측정법, 동일 반응계 내에서의 면역 측정법(예를 들면, 콜로이드질 금, 효소 또는 방사성 동위 원소 라벨을 사용함), 웨스턴 블롯, 침강 반응, 응집 측정법(예: 한천 응집 측정법, 적혈구 응집 측정법), 보체 결합 측정법, 면역 형광 측정법, 단백질 A 측정법 및 면역 전기 영동법 등]에 의해 달성될 수 있다. 한 가지 양태에 있어서, 항체 결합은 일차 항체에서 라벨을 검출함으로써 달성된다. 또 다른 양태에 있어서, 일차 항체는 이차 항체의 결합 또는 일차 항체에 대한 시약을 검출함으로써 달성된다. 또 다른 양태에 있어서, 이차 항체가 라벨링된다. 다수의 수단은 면역 측정에서 결합을 검출하기 위해 공지되어 있으며 본 발명의 범주내이다.

항체는 시험관내에서, 예를 들면, 라벨(예: 효소, 플루오로포어(fluorophores), 발색단, 방사성 동위 원소, 염료, 콜로이드질 금, 라텍스 입자 및 화학 발광체)를 사용하여 라벨링될 수 있다. 달리, 항체는 검출을 위해 생체내에서, 예를 들면, 방사성 동위 원소(바람직하게는 테크네슘 또는 요오드); 자기 공명 이동제(예: 가돌리늄 및 마그네슘); 또는 방사선 불투명화제를 사용하여 라벨링될 수 있다.

이러한 연구를 위해 거의 통상적으로 사용되는 라벨은 방사 활성 요소, 효소, 자외선 광에 노출되는 경우에 형광 현상을 나타내는 화학 제품 등이다. 다수의 형광 물질은 공지되어 있으며 라벨로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들면, 플루오레신, 로다민, 오라민, 텍사스 레드(Texas Red), AMCA 블루 및 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow)를 포함한다. 특히 검출되는 물질은 콜린에서 제조되고 이소티오시아네이트를 통해 플루오레신과 결합된 항-도끼 항체이다. 폴리펩티드는 또한 방사 활성 요소 또는 효소를 사용하여 라벨링된다. 방사 활성 라벨은 현재 이용되는 임의의 카운트 과정에 의해 검출될 수 있다. 바람직한 동위 원소는 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I 및 ¹⁸⁶Re로부터 선택될 수 있다.

효소 라벨이 마찬가지로 유용하며, 현재 이용되는 비색법, 분광 광도법, 형광 분광 광도법, 암페어법 또는 가스 측정법에 의해 검출될 수 있다. 효소는 브릿지 분자(예: 카보디이미드, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드 등)와의 반응에 의해 선택된 입자에 결합된다. 이러한 과정에서 사용될 수 있는 다수의 효소는 공지되어 있으며 이용될 수 있다. 퍼옥시다제, β-글루쿠로니다제, β-D-갈락토시다제, 우제아제, 글루코즈 옥시다제 및 퍼옥시다제와 알칼리성 포스페이타제가 바람직하다. 미국 특허 제3,654,090호, 미국 특허 제3,850,752호 및 미국 특허 제4,016,043호에는, 별도의 라벨링 물질과 방법에 대한 설명에 대해 예로써 언급된다.

본 발명의 또 다른 실시양태에 있어서, 의학 전문의가 사용하기에 적합한 통상적인 시험 키트는 추측되는 타겟 세포에 소정의 결합 활성 또는 소정의 결합 활성 수용 능력의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 제조

될 수 있다. 위에서 토의한 시험 기술에 따라, 이러한 키트 중의 한 가지 그룹은, 물론 선택된 방법(예: "경합", "샌드위치", "DASP" 등)에 따라, 하나 이상의 라벨링된 폴리펩티드 또는 이의 결합 파트너, 예를 들면, 이에 대한 항체 특이성 및 방향을 포함한다. 이러한 키트는 또한 주위 시약(예: 완충제, 안정화제 등)을 포함할 수도 있다.

따라서, 시험 키트는 다음을 포함하는 소정의 세균성 결합 활성에 대해 세포의 존재 또는 수용 능력을 입증하기 위해 제조될 수 있다:

폴리펩티드 또는 이에 대한 특이 결합 파트너의 존재에 대한 직간접 결합에 의해 수득된 소정량의 하나 이상의 라벨링된 면역 화학적 반응성 성분(a),

기타 시약(b) 및

위의 키트를 사용하기 위한 방향(c).

본 발명은 펩티드 분절, 핵산 분자, 라이보자임, 폴리펩티드, 소형 분자, 탄수화물 분자, 모노사카라이드, 올리고사카라이드 또는 항체를 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는 길항제 또는 차단제를 제공한다. 또한, 페렴 구균 박테리움을 경쟁적으로 차단하거나 억제하는 시약은 본 발명에 의해 예상된다. 본 발명은 무기 화합물, 핵산 분자, 올리고뉴클레오티드, 유기 화합물, 펩티드, 펩티드 유사성 화합물 또는 폴리펩티드를 억제하는 단백질을 포함하는 시약을 제공한다.

본 발명은 임의의 SEQ ID NOS: 1, 3-7, 9-11, 22 및 23으로 나타내는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 백신 및 억제학적으로 허용되는 조절제 또는 담체를 제공한다. 폴리펩티드는 도 2에 나타내는 바와 같이 선단된 N-말단 콜린 결합 단백질 A의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본 발명은 도 2에 나타내는 바와 같은 보존 부위를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 백신 및 억제학적으로 허용되는 조절제 또는 담체를 제공한다. 예를 들면, 보존 부위는 아미노산 서열 158 내지 172; 300 내지 321; 331 내지 339; 355 내지 365; 367 내지 374; 379 내지 389; 409 내지 427 및 430 내지 447을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는다. 본 발명은 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산을 포함하는 백신 및 억제학적으로 허용되는 조절제 또는 담체를 제공한다.

그램 양성 세균, 특히 페렴 구균에 대한 활성 면역성은 면역원성 양의 폴리펩티드 또는 펩티드 유도체 또는 이의 분절과 보조제를 사용하여 면역화(접종)에 의해 유도될 수 있으며, 여기서 폴리펩티드 또는 이의 항원 유도체 또는 이의 분절은 백신의 항원 성분이다.

본 발명의 폴리펩티드, 이의 유도체 또는 이의 분절은 백신을 제조하기 위해 보조제와 혼합하여 제조될 수 있다. 바람직하게는, 백신의 항원 성분으로서 사용되는 이의 유도체 또는 이의 분절은 아드헤진은이다. 보다 바람직하게는, 백신의 항원 성분으로서 사용되는 폴리펩티드 또는 이의 펩티드 유도체 또는 이의 분절은 그램 양성 세균의 종류의 전체 또는 다수의 균주에 공통하는 항원 또는 밀접하게 관련된 세균의 종류에 공통하는 항원이다. 가장 바람직하게는, 백신의 항원 성분은 공통 항원인 아드헤진은이다.

본 발명의 핵산계 백신을 함유하는 벡터는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들면, 트랜스팩션, 일렉트로포레이션(electroporation), 마이크로주입법, 변환, 세포 융합, DEAE 덱스트린, 칼슘 포스페이트 침전, 리포팩션(리포솜 융합), 유전자 검의 사용에 의해 바람직한 숙주 또는 DNA 벡터 전달체[참조: Wu et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:963-967; Wu and Wu, 1988, J. Biol. Chem. 263: 14621-14624; Hartmut et al., Canadian Patent Application No. 2,012,311, filed March 15, 1990]로 도입될 수 있다.

백신은 근육내, 복막내, 정맥내 등을 포함하지만, 이로써 제한되지는 않는 임의의 경구 경로로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 백신화의 바람직한 결과가 항원에 대한 면역 반응을 설명하기 때문에, 병원성 생물에 대한 직접 투여하거나, 간접적으로 림프질 조직(예: 림프 마디 또는 비장)에 대해 바이러스성 벡터의 선택 또는 타겟팅에 의해 바람직하다. 면역 세포는 계속해서 반복하기 때문에, 이들은 레트로바이러스성 벡터계 핵산 백신에 대한 실제 타겟인데, 이는 레트로바이러스가 반복 세포를 필요로 하기 때문이다.

수동 면역은 본 발명의 폴리펩티드에 대해 환자에게 면역 혈청, 다클론성 항체 또는 중화 단일 클론성 항체를 투여하여 그램 양성 박테리아, 바람직하게는 연쇄구균, 보다 바람직하게는 페렴 구균으로 전염병을 앓고 있을 것으로 추측되는 동물 대상과 비교할 수 있다. 수동 면역은 장기간 보호되지 않지만, 백신화되지 않는 피험자의 세균 감염의 치료에 대해 귀중한 수단일 수 있다. 수동 면역은 그램 양성 세균의 항체 저항 균주의 치료에 대해 특히 중요한데, 이는 다른 치료법이 이용되지 않기 때문이다.

바람직하게는, 수동 면역 치료법에 대해 투여되는 항체는 자가 항체이다. 예를 들면, 피험자가 수렴인 경우, 바람직하게는 항체는 사람 기원의 항체이거나 항체에 대해 면역 반응이 가능성을 최소화하기 위해 "인간화"된다. 본 발명의 능동 또는 수동 백신, 또는 아드헤진의 투여는 그램 양성 세균, 바람직하게는 연쇄상 구균, 보다 바람직하게는 페렴 구균의 감염으로부터 동물 피험자를 보호하는 데 사용될 수 있다.

본 발명은 일정량의 기술된 폴리펩티드 및 억제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 억제학적 조성물을 제공한다.

예를 들면, 정맥 표면으로 폐렴구균 부착을 방지하기 위한 이러한 억제학적 조성물은 렉틴 도메인에 대한 항체 및/또는 가용성 과량의 렉틴 도메인 단백질에 대한 항체를 포함할 수 있다. 어떠한 기작에 의해서도 점착을 차단함으로써 감염에서의 초기단계가 차단되어 콜로니 생성을 감소시키게 된다. 이는 다시 사람을 매개체로한 전염을 감소시키게 되어 증후성 질환의 발병을 예방하게 된다.

본 발명은 일정량의 억제 조성물을 개체에게 투여하여 면역 반응을 유도함을 포함하여 폐렴구균으로 감염되거나 이에 노출된 개체에서 면역 반응을 유도하기 위한 방법을 제공한다.

본 발명은 폐렴구균 세균 부착을 예방하기에 효과적인 양의 억제학적 조성물의 일정량을 개체에게 투여하여 폐렴구균에 의한 감염을 예방함으로써, 개체의 폐렴구균에 의한 감염을 예방하는 방법을 제공한다.

본 발명은 항체 및 억제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 억제학적 조성물 일정량을 개체에게 투여하여 폐렴구균에 의한 감염을 예방함을 포함하여 폐렴구균에 의한 개체의 감염을 예방하기 위한

방법을 제공한다.

본 발명은 환자에게 본 발명의 백신 치료학적 유효량을 투여하여 환자를 치료함을 포함하는, 폐렴구균 박테리아에 감염되거나 이에 노출된 환자를 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 아미노산 서열 확인 번호 1, 3 내지 5, 7 또는 9 내지 11로 나타난 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 포함하는 약제학적 조성물의 소정량을 환자에게 투여하여 면역 반응을 유도함을 포함하는, 폐렴구균 박테리아에 감염되거나 이에 노출된 환자의 숙주 세포의 콜론화를 억제하는 방법을 제공한다. 콜론화를 차단하는 치료적 펩티드는 호흡기 점막에 의해 전달된다. 약제학적 조성물은 도 2에 나타난 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드를 포함한다.

본원에 사용된 용어, "약제학적 조성물"은 폐렴구균 콜론화를 방지하는 치료적 효과 또는 이점을 제공하기에 유용한 적합한 희석제, 방부제, 가용화제, 유화제, 보조제 및/또는 담체와 함께 본 발명의 치료학적 유효량의 폴리펩티드 생성물을 의미한다. 본원에 사용된 용어, "치료학적 유효량"은 제시된 질환 및 투여 양생법에 치료적 효과를 제공하는 양을 언급한다. 이러한 조성물은 액체이거나, 동결건조 또는 건조된 제형으로서 완충액 함량, pH 및 이온 농도가 다양한 희석제(예: 트리스-HCl, 아세테이트, 인산염), 표면으로의 흡착을 방지하는 알부민 또는 젤라틴과 같은 부가제, 세제[예: 트윈(Tween) 20, 트윈 80, 플루로닉(Pluronic) F68, 당즙산염], 가용화제(예: 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤), 산화방지제(예: 아스코르브산, 나트륨 메타비설파이트), 방부제(예: 티메osal, 벤질 알콜, 파라벤), 벌킹 물질 또는 강장 조절제(예: 락토즈, 만니톨), 폴리에틸렌 글리콜과 같은 중합체의 단백질로의 공유 결합, 금속 이온과의 착체화, 또는 물질의 폴리락트산, 폴리글리콜산, 하이드로겔 등과 같은 중합성 화합물의 미립자 제제 속으로의 또는 그 위로의 도입, 또는 리포솜, 미세유화액, 미셀, 단층 또는 다층 소낭, 크리트로사이드 고스트 또는 스피로플라스트 위로의 도입이 포함된다. 이러한 조성물은 물리적 상태, 용해도, 안정성, 생체내 방출 속도, 및 치료제의 생체내 청소율에 영향을 미친다. 조성물의 선택은 치료 활성을 갖는 단백질의 물리적 및 화학적 특성에 좌우된다. 예를 들면, 막 결합된 활성형으로부터 유도된 생성물은 세제를 함유하는 제형을 필요로 한다. 조절되거나 지연된 방출 조성물은 제형을 친지성 저유소(예: 지방산, 왁스, 오일)로 포함한다. 또한, 본 발명의 조성물은 중합체(예: 폴록사머 또는 폴록사민)로 피복된 미립자 조성물이고 조직 특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대한 항체에 결합되거나 조직 특이적 수용체에 대한 항체에 결합된 활성형이다. 본 발명의 조성물의 다른 양태에서는 비경구, 폐, 비강 및 경구를 포함하는 다양한 투여 경로에 대한 보호 피막, 프로테아제 억제제 또는 침투 증강제를 형성하는 미립자를 도입시킨다.

또한, 본원에 사용된 용어, "약제학적으로 허용되는 담체"는 당해 분야의 숙련자에게 널리 공지되어 있고 이에 0.01 내지 0.1M, 바람직하게는 0.05M의 인산염 완충액 또는 0.8%의 염수가 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추가로, 이러한 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 유액일 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성유, 및 에틸렌 올레이트와 같은 주사용 유기 에스테르가 있다. 수성 담체에는 염수 및 완충 매질을 포함한 물, 알콜성/수성 용액, 유액 또는 현탁액이 포함된다. 비경구 담체는 염화나트륨 용액, 링거 덱스트로즈, 덱스트로즈 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거액 또는 비취발성 오일을 포함한다. 정맥내 담체는 유동 영양 보충물, 링거 덱스트로즈와 같은 전해질 보충물 등을 포함한다. 방부제 및 기타 부가제가 또한 존재할 수 있고, 예를 들면, 항균제, 산화방지제, 콜로이드화제, 불활성 기체 등일 수 있다.

용어, "보조제"는 항원에 대한 면역 반응을 증강시키는 화합물 또는 혼합물일 수 있다. 보조제는 항원을 서서히 방출시키는 조직 저유소로서 및 면역 반응을 비특이적으로 증강시키는 임파성 시스템 활성화로서 제공될 수 있다[참조: Hood et al., Immunology, Second Ed., 1984, benjamin/Cummings: Menlo Park, California, p.384]. 종종 보조제의 부재하에서의 항원 단독의 주요 챌린지는 체액 또는 세포 면역 반응을 유도하는데 실패한다. 보조제는 완전 프로인트(Freund) 보조제, 불완전 프로인트 보조제, 사포닌, 미네랄 겔(예: 산화알루미늄), 표면 활성 물질(예: 리소세틴, 플루로닉 글리콜, 다중 음이온, 펩티드, 오일 또는 탄화수소 유액), 키울 림피트 헤모시아닌, 디니트로페놀 및 잠재적으로 유용한 사람 보조제(예: BCG(바실 칼메테-구에린)) 및 코리네박테리움 파르붐을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 보조제는 약제학적으로 허용된다.

조절 또는 지연 방출 조성물은 친지성 디포우(예: 지방산, 왁스, 오일)를 포함한다. 또한, 중합체(예: 폴록사머 또는 폴록사민)로 코팅된 미립 조성물 및 조직-특이적 수용체, 리간드 또는 항원에 대해 지시된 항체에 커플링되거나 조직-특이적 수용체의 리간드에 커플링된 화합물도 본 발명에 의해 이해된다. 본 발명이 조성물의 기타 양태는 비경구, 폐, 비 및 경구를 포함한 다양한 경로의 투여를 위한 미립형 보호 코팅, 프로테아제 억제제 또는 침투 증진제를 삽입한다. 투여하는 경우, 화합물은 종종 점막 표면 또는 순환으로부터 신속하게 밝혀지고, 따라서, 비교적 단수명의 약제학적 활성을 유도해낼 수 있다. 결과적으로, 종종 생활성 화합물의 비교적 다량의 투여는 치료학적 효율을 지속시키는 데 필요할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜과의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로스, 덱스트란 폴리비닐 알콜, 폴리비닐피롤리돈 또는 폴리피롤 등의 수용성 중합체를 공유적으로 부착시킴으로써 개질된 화합물은 상응하는 개질되지 않은 화합물보다 혈액에서 실질적으로 긴 반수명의 다음 정맥 주사를 나타내는데 밝혀져있다[참조: Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; and Katre et al., 1987]. 상기한 변형은 또한 수용액 중의 화합물의 용해도를 증가시키고, 응집물을 제거하고, 화합물의 물리 화학적 안정성을 향상시키고 화합물의 면역원성 및 반응성을 크게 감소시킬 수 있다. 결과적으로, 목적인 생체내 생물학적 활성은 상기한 중합체-화합물 부가물을 비개질된 화합물보다 덜 자주 또는 적은 투여량으로 투여함으로써 달성된다.

투여량. 충분한 투여량은 약 1µg/kg 내지 약 1000mg/kg일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 투여량은 10mg/kg일 수 있다. 치료학적으로 허용되는 조성물의 제형은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

위에서 언급한 바와 같이, 본 발명은 숙주 세포에 접착하는 것과 같은 폐렴 구균의 병원성 활성에 대항하기 위한, 매개체, 백신, 폴리펩티드, 핵산 및 항체, 항항체 및 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함

하는 치료 조성물을 제공한다.

활성 성분을 함유하는 치료 조성물의 제조는 당해 기술분야에서 잘 이해되고 있다. 통상적으로, 이러한 조성물은 비인강에 전달되는 폴리펩티드의 에어로졸로서, 주사제로서, 액체 용액 또는 현탁액으로서 제조되지만, 주사하기 전 액체인 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태가 또한 제조될 수 있다. 제제는 또한 유향될 수 있다. 치료 활성 성분은 종종 약제학적으로 허용되고 활성 성분과 혼화성인 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는, 예를 들면, 물, 식염수, 덱스트로스, 글리세롤, 에탄올 또는 이들의 혼합물이다. 또한, 필요한 경우, 조성물은 활성 성분의 효과를 증진시키는 습윤 또는 유향제, pH 완충제를 소량으로 함유할 수 있다.

활성 성분은 중화된 약제학적으로 허용되는 염 형태로서 치료 조성물로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 염은 산 부가염(폴리펩티드 또는 항체 분자의 유리 아미노 그룹으로 형성된다)을 포함하고, 이는 예를 들면, 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산과 같은 유기산으로 형성된다. 유리 카복실산으로부터 형성된 염은 또한 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 또는 철 수산화물과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인과 같은 유기 염기로부터 유도될 수 있다.

조성물 속에서 단백질, DNA, 매개체(A 및 B가 속하는 종의 카테고리에 좌우된다)의 약 75중량% 이상이 "A"인 경우, "A"(여기서, "A"는 단일 단백질, DNA 분자, 매개체 등이다)를 포함하는 조성물은 실질적으로 "B"(여기서, "B"는 하나 이상의 오염 단백질, DNA 분자, 매개체 등이다)를 함유하지 않는다. 바람직하게는, "A"는 조성물 속의 A+B 종의 약 90중량% 이상을 차지하고, 가장 바람직하게는 약 99중량% 이상을 차지한다.

"치료학적 유효량"은 본 명세서에서는 균주의 활성, 작용 및 반응을 약 15% 이상, 바람직하게는 50% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상 감소시키기에 충분한 양, 가장 바람직하게는 임상적으로 유의성 부족을 방지하기에 충분한 양을 의미하는 것으로 사용된다. 또한, 치료학적으로 유효량은 균주에서 임상적으로 유의한 조건을 향상시키기에 충분하다. 본 발명에 있어서, 균주의 반응에 있어서의 부족은 세균 감염의 계속 또는 분산에 의해 입증된다. 균주의 임상적으로 유의한 조건의 향상은 세균 하중의 감소, 콜론화된 균주 세포로부터 세균의 투명화, 감염과 관련된 열 또는 염증의 감소 또는 세균 감염과 관련된 특정 증상의 감소를 포함한다.

본 발명에 따라서, 본 발명의 치료 조성물의 성분 또는 성분들은, 비경구적으로, 점막을 통해서, 예를 들면, 경구, 코, 폐, 직장 또는 경피로 도입될 수 있다. 비경구적으로, 예를 들면, 정맥내 주사, 및 비제한적으로 동맥내, 근육내, 피내, 피하, 복막내, 심실내 및 두개내 투여가 바람직하다. 경구 또는 폐 전달은 점막 면역성을 활성화하는 데 바람직할 수 있고, 폐연구균이 일반적으로 비인두 및 폐 점막을 콜론화하기 때문에 점막 면역는 특히 효과적인 예방치료법일 수 있다. 용어 "단위 용량"은 본 발명의 치료 조성물에 대하여 사용되는 경우, 사람에게 대한 단일 용량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며, 각각의 단위는 필요한 희석제, 즉, 담체 또는 비히클과 함께 목적하는 치료 효과를 생성시키기 위해 계산된 예정된 양의 활성 물질을 함유한다.

또 다른 양태에서, 활성 화합물은 소포, 특히 리포솜에 전달될 수 있다[참조: Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (des.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327].

또 다른 양태에서, 치료 조성물은 조절 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 예를 들면, 폴리펩티드는 정맥내 주입, 이식 삼투성 펌프, 경피 패치, 리포솜 또는 기타 투여 방식을 사용하여 투여될 수 있다. 하나의 양태에서, 펌프가 사용될 수 있다[참조: Langer, *supra*; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)]. 또 다른 양태에서, 중합체성 재료가 사용될 수 있다[참조: Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability. Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983); Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)]. 또 다른 양태에서, 조절 방출 시스템은 치료 표적, 즉 뇌 근처에 위치하여 시스템 용량의 단편만을 요구할 수 있다[참조: Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 22, pp. 115-138 (1984)]. 바람직하게는, 조절 방출 장치는 대상의 부적합한 면역 활성 또는 종양 부위 근처에 도입된다. 다른 조절 방출 시스템은 광거의 문헌[참조: Science 249:1527-1533 (1990)]에서 논의되고 있다.

위에서 언급한 활성 성분의 투여가 세균 감염에 대한 효과적인 치료 섭생인 대상은 바람직하게는 사람이지만, 모든 동물일 수 있다. 따라서, 당해 기술분야의 숙련인들이 쉽게 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 모든 동물, 특히 고양이 또는 개와 같은 가축, 비제한적으로, 소, 말, 콜린, 양, 및 돼지와 같은 사육 동물, 야생동물(야생 또는 동물원의 동물), 마우스, 래트, 토끼, 콜린, 양, 피그, 개, 고양이 등과 같은 수의학용 연구 동물 등을 포함하는 포유 동물에게 투여하기에 특히 적합하다.

본 발명의 치료 방법 및 조성물에서, 활성 성분의 치료학적 유효량이 제공된다. 치료학적 유효량은 당해 기술분야에 익히 공지되어 있는 바와 같이 의료인에 의해 환자 특성(나이, 체중, 성별, 증상, 합병증, 다른 질환 등)을 근거로 하여 결정될 수 있다. 또한, 또 다른 경로 연구가 수행되기 때문에, 보다 구체적인 정보는 각종 환자의 각종 증상의 치료를 위해 적합한 용량에 대해 분명해질 것이고, 당해 기술분야의 숙련인들은 수용체의 치료 경위, 나이 및 일반적인 건강을 고려하여 적합한 용량을 알아낼 수 있다. 일반적으로, 정맥내 주사 또는 주입용으로, 복막내, 근육내 또는 다른 투여 경로로부터 투여량이 적을 수 있다. 투여 스케줄은 순환 반감기 및 사용되는 제형에 따라서 다를 수 있다. 조성물은 치료학적 유효량의 투여 제형에 적합한 방식으로 투여된다. 투여하는 데 필요한 정확한 양의 활성 성분은 수행자의 판단에 좌우되고 개인에 따라 특수하다. 그러나, 적합한 용량은 1일당 개인 체중 1kg당 약 0.1 내지 20, 바람직

하계는 약 0.5 내지 약 10, 보다 바람직하게는 1 내지 수mg일 수 있고 투여 경로에 좌우된다. 초기 투여 및 두번째 예방주사에 적합한 선택 또한 다양하지만, 초기 투여 후 1시간 이상의 간격으로 주사 또는 다른 투여로 반복 투여되는 것으로 유형화된다. 또한, 혈액 내에서 10나노몰 내지 10마이크로몰 농도를 유지시키기엔 충분한 연속 정맥내 주입이 고려된다.

다른 화합물과 함께 투여: 세균 감염 치료를 위해서, 본 발명의 활성 화합물을 비제한적으로 (1) 항생제, (2) 가용성 탄수화물 세균 접착 억제제, (3) 다른 소분자량 세균 접착 억제제, (4) 세균 대사, 수송 또는 변형 억제제, (5) 세균 용해 자극제 또는 (6) 다른 세균 항원에 대한 항세균제, 항체 또는 백신을 포함하는 세균 감염을 치료하는 데 사용되는 하나 이상의 약제학적 조성물과 함께 투여할 수 있다. 다른 강력한 활성 성분은 스테로이드 및 비스테로이드 항염증 약물과 같은 항염증제를 포함한다. 동시에 투여(예를 들면, 본 활성 성분과 항생제의 혼합물의 투여)하거나 따로 투여할 수 있다.

따라서, 특정 양태에서, 치료 조성물은 유효량의 활성 성분 및 하나 이상의 다음 활성 성분을 추가로 포함할 수 있다: 항생제, 스테로이드. 예시적인 제형은 다음과 같다:

정맥내 제형 I

성분	mg/ml
세포탁심	250.0
폴리펩티드	10.0
덱스트로즈 USP	45.0
아황산나트륨 USP	3.2
에데테이트 이나트륨 USP	0.1
주사용수	1.0ml

정맥내 제형 II

성분	mg/ml
암피실린	250.0
폴리펩티드	10.0
아황산나트륨 USP	3.2
이나트륨 에데테이트 USP	0.1
주사용수	1.0ml

정맥내 제형 III

성분	mg/ml
겐타마이신(황산염으로서 충전)	40.0
폴리펩티드	10.0
아황산나트륨 USP	3.2
이나트륨 에데테이트 USP	0.1
주사용수	1.0ml

정맥내 제형 IV

성분	mg/ml
폴리펩티드	10.0
덱스트로즈 USP	45.0
아황산나트륨 USP	3.2
에데테이트 이나트륨 USP	0.1
주사용수	1.0ml

정맥내 제형 V

성분	mg/ml
폴리펩티드 길항제	5.0
아황산나트륨 USP	3.2
이나트륨 에데테이트 USP	0.1
주사용수	1.0ml

따라서, 균주 세포의 세균 매개된 결합으로부터 발생하는 감염을 감소시키거나 억제하는 데 필요하거나 이에 대한 항체 또는 이의 리간드 또는 이 리간드에 대한 항체가 필요한 특정한 경우, 폴리펩티드를 도입

시켜 세균과 균주 세포의 상호작용을 차단시킨다.

본원에서는 점착 억제제(또는 이의 유도체)로서 작용하는 렉틴 활성을 갖는 본 폴리펩타이드의 폐 전달이 또한 고려된다. 점착 억제제(또는 유도체)는 포유 동물의 폐로 전달되어 세균, 즉 연쇄상 구균 및 바람직하게는 폐렴 구균의 숙주 세포에 대한 결합을 억제할 수 있다. 다른 폐 전달용 단백질 제조에 대한 보고가 선행 기술분야에서 발견된다[참조: Adjei et al. *Pharmaceutical Research*, 7:565-569 (1990); Adjei et al., *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (1990) (leuprolide acetate); Braquet et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (suppl. 5): 143-146 (1989)(endothelin-1); Hubbard et al., *Annals of Interna Medicine*, Vol. 111, pp. 206-212 (1989)(α 1-antitrypsin); Smith et al., *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (1989) (α -1protease); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (1990) (recombinant human growth hormone); debs et al., *J. Immunol.* 140:3482-3488 (1988)(interferon- γ and tumor necrosis factor alpha); Platz et al., US. Patent No. 5,284,656 (granulocyte colony stimulating factor)]. 약물의 폐 전달 방법 및 이를 위한 조성물이 웡(Wong) 등에게 허여된 미국 특허 제5,451,569호(1995.9.19)에 기재되어 있다.

이러한 모든 장치는 점착 억제제(또는 유도체)의 분산에 적합한 제형의 사용을 필요로 한다. 통상적으로, 각각의 제형은 사용되는 장치의 유형에 특수하며 특히 치료에 유용한 통상적인 희석제, 보조제 및/또는 담체 이외에 적합한 추진제 물질을 포함할 수 있다. 또한, 복합체를 포함하여 리포솜, 마이크로캡슐 또는 마이크로구 또는 다른 유형의 담체의 사용이 또한 고려된다. 화학적으로 개질된 점착 억제제는 화학적 개질의 유형 또는 사용되는 장치의 유형에 따라서 다른 제형으로 제조될 수도 있다.

네블라이저(nebulizer), 제트 또는 초음파와 함께 사용하기에 적합한 제형은 통상적으로 용액 1ml당 생물학적 활성 점착 억제제 약 0.1 내지 25mg의 농도로 물 속에 용해된 점착 억제제(또는 유도체)를 포함한다. 제형은 또한 완충제 및 단순 당(예: 점착 억제제 안정화 및 삼투압 조절을 위해서)을 포함할 수 있다. 네블라이저 제형은 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무에 의해 발생하는 점착 억제제의 표면 유도 응집을 감소시키거나 방지하기 위해서 계면활성제를 함유할 수 있다.

계량 용량 흡입 장치와 함께 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제와 함께 추진제에 현탁된 점착 억제제(또는 유도체)를 함유하는 미분 분말을 포함한다. 추진제는 이러한 목적에 통상적으로 사용되는 물질, 예를 들면, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄올 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄올을 포함하는 탄화수소, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 계면활성제는 소르비탄 트리올레에이트 및 콩 레시틴을 포함한다. 올레산이 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다.

액체 에어로졸 제형은 생리학적으로 허용되는 희석제 속에 점착 억제제와 분산제를 함유한다. 본 발명의 건조 분말 에어로졸 제형은 미분된 고체 형태의 점착 억제제와 분산제로 이루어진다. 액체 또는 건조 분말 에어로졸 제형에 있어서, 제형을 에어로졸화한다. 즉, 에어로졸화된 용량이 실제로 비강 또는 폐의 점막에 도달하는 것을 보장하기 위해서 액체 또는 고체 입자도 파쇄된다. 용어 "에어로졸 입자"는 본 명세서에서 코 또는 폐 투여에 적합한, 즉 점막에 도달하는 액체 또는 고체 입자를 기재하는 데 사용된다. 전달 장치의 구성, 제형에서의 추가 성분 및 입자 특성과 같은 다른 고려사항이 중요하다. 약의 폐 투여에 대한 이러한 측면은 공지되어 있으며 제형화 처리, 에어로졸화 수단 및 전달 장치의 구조는 당업자에게 알려진 대부분의 일반적 실험으로 충분하다. 구체적인 실시 태양에서, 약 입자가 폐포에 확실히 이르게 하기 위한 질량 평균 동적 지름은 5 마이크로미터 이하일 것이다[Wearley, L.L., *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems* 8:333(1991)].

에어로졸 운반 체계, 예를 들면 가압 측정량 흡입 및 건조 분말 흡입이 뉴만(Newman), S.P.의 문헌 [*Aerosols and the Lung*, Clarke, S.W. and Davia, D. editors, pp 197-22]에 기술되어 있으며 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다.

또 다른 실시 태양에서, 아래에 자세히 기술된 바와 같이 본 발명의 에어로졸 제제는 부착 억제제 외에 치료학적 또는 약제학적 활성 인자, 예를 들면 이에 한정되는 것은 아니나 항생제, 스테로이드, 비-스테로이드성 항염제 등을 포함할 수 있다.

액상 에어로졸 제제.

본 발명은 에어로졸 제제를 제공하며 용량은 박테리아, 예로 스트렙토코칼, 특히 폐렴구균 감염으로 고통받는 환자 치료에 사용하도록 정한다. 일반적으로, 이러한 용량 형은 약제학적으로 허용가능한 담체 중의 부착 억제제를 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체는 이에 한정되는 것은 아니지만 증류수, 염수, 완충 살린, 덱스트로스 용액 등을 포함한다. 특정 실시 태양에서, 본 발명에 사용될 수 있는 담체 또는 본 발명의 약제학적 제제는 포스페이트 완충 염수 또는 일반적으로 pH 7.0-8.0 범위의 완충 염 용액 또는 물이다.

본 발명의 액상의 에어로졸 제제는 부가 재료로 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석액, 수용화 또는 유화제, 계면활성제 및 부형제를 포함할 수 있다. 상기 제제는 담체를 포함할 수 있다. 담체는 순환계에서 용해되고 약제학적으로 허용되는 거대분자이며, 여기서 약제학적으로 허용된다 함은 당업자가 치료의 일부로서 환자에게 상기 담체를 주입할 수 있음을 의미한다. 바람직하게는 담체는 제거(clearance)를 위한 허용가능한 플라스마 반감기를 갖는 순환계에서 비교적 안정하다. 상기한 거대분자는 소아 레시틴, 올레산 및 소르비탄 트리올레에이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않고, 소르비탄 트리올레에이트가 바람직하다.

본 발명의 양태의 제형은 또한 pH 유지, 용액 안정화, 또는 삼투압 조절용으로 유용한 기타 제제를 포함할 수 있다. 이러한 제제의 예에는 염화나트륨 또는 염화칼륨과 같은 염 및 글루코스, 갈락토스 또는 만노스와 같은 탄수화물 등이 포함된다.

본 발명은 또한 점착 억제제 및 다른 치료학적 유효 약물, 예를 들어 항생제, 스테로이드, 비스테로이드

성 소염제 등을 포함하는 액체 에어로졸 제형을 예상한다.

에어로졸 무수 분말 제형, 당해 에어로졸 제형은 접착 억제제의 미분된 분말 형태 및 분산제를 포함하는 무수 분말 제형으로서 제조될 수 있다는 것도 또한 예상된다.

분말 흡입 장치로부터 분산시키기 위한 제형은 접착 억제제(또는 유도체)를 함유하는 미분된 무수 분말을 포함하고, 또한 락토즈, 소르비톨, 슈크로스 또는 만니톨과 같은 벌크화제를 장치로부터 분말의 분산을 촉진시키는 양, 예를 들어 제형의 50 내지 90중량%의 양으로 포함할 수 있다. 접착 억제제(또는 유도체)는 말초 폐로의 가장 효과적인 전달을 위해 가장 유리하게는 평균 입자 크기가 10mm(또는 μ) 미만, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5mm의 미립자 형태로 제조되어야 한다. 또 다른 양태에서, 무수 분말 제형은 접착 억제제를 함유하는 미분된 무수 분말, 분산제 및 또한 벌크화제를 포함할 수 있다. 본 발명의 제형과의 혼합물로서 유용한 벌크화제는 락토즈, 소르비톨, 슈크로스 또는 만니톨과 같은 제제를 장치로부터 분말의 분산을 촉진시키는 양으로 포함한다.

본 발명은 또한 접착 억제제와 치료학적으로 유효한 약물, 예를 들어 항생제, 스테로이드, 비스테로이드 성 소염제 등을 포함하는 무수 분말 제형을 예상한다.

일반적으로, 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990(Mark Publishing Co. Easton PA 18042) at Chapter 89]에 기술된 경구 고형물 투여 제형이 본원에서 사용하기 위해 예상된다. 고형물 투여 제형은 정제, 캡슐제, 환제, 트로치 또는 로젠지, 카세 또는 펠릿을 포함한다. 또한, 리포소말 또는 프로테노이드 캡슐화는 본 발명의 조성물을 제형화하는데 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,925,673호에 보고된 프로테노이드 중심체). 리포소말 캡슐화가 사용될 수 있고, 리포솜은 각종 중합체를 사용하여 유도될 수 있다(예: 미국 특허 제5,013,556호). 치료를 위한 가능한 고형물 투여 제형의 설명은 본원에 참조로 인용된 문헌[참조: Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G.S. Banker and C.T. Rhodes Chapter 10, 1979]에 기재되어 있다. 일반적으로 제형은 성분(들) 및 위 주위 환경을 보호하고 생물학적으로 활성인 물질을 장에 방출시키는 성분(들) (또는 이의 화학적으로 개질된 형태) 및 불활성 성분을 포함한다.

또한, 상기 유도된 성분(들)의 경구 투여 제형이 구체적으로 예상된다. 성분(들)은 화학적으로 개질되어 유도체의 경구 전달에 효과적일 수 있다. 일반적으로, 예상되는 화학적 개질은 성분 분자 그 자체에 하나 이상의 잔기가 부착되는 것이고, 이러한 잔기는 (a) 단백질 분해를 억제하고, (b) 위 또는 장으로부터 혈류속으로의 섭취를 허용한다. 또한, 성분(들)의 전제 안정성을 증가시키고, 신체 내에서의 순환 시간을 증가시키는 것이 목적이다. 이러한 잔기의 예에는 폴리에틸렌 글리콜, 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 카복시메틸 셀룰로즈, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리프롤린 포함된다[참조: Abuchowski and Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" In: Enzymes as Drugs, Hochenberg and Roberts, eds., Wiley-Interscience, New York, NY, pp. 367-383; Newmark, et al., 1982, J. Appl. Biochem. 4: 185-189]. 사용될 수 있는 기타 중합체는 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-트리옥소칸이다. 상기한 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 잔기가 약제학적 용도로 바람직하다.

성분(또는 유도체)의 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장 또는 회장) 또는 대장일 수 있다. 당업자는 위에 용해되지 않지만 십이지장 또는 그밖의 장에 물질을 방출시키는 제형을 이용할 수 있다. 바람직하게는, 방출은 단백질(또는 유도체)의 보호에 의해 또는 위 주위 환경 이외, 예를 들어 장에 생물학적 활성 물질을 방출시킴으로써 위 주위 환경의 유해한 효과를 피한다.

pH 5.0에서 불침투성인 피복물의 완전한 위 내성을 보장하는 것이 필수적이다. 장용피로서 사용되는 보다 통상적인 불활성 성분의 예에는 셀룰로즈 아세테이트 트리멜레테이트(CAT), 하이드록시프로필메틸셀룰로즈 프탈레이트(HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 유드라기트(Eudragit) L30D, 아쿠아터릭(Aquateric), 셀룰로즈 아세테이트 프탈레이트(CAP), 유드라기트 L, 유드라기트 S 및 셀락이 포함된다. 이러한 피복물은 혼합 필름으로서 사용될 수 있다.

코팅 또는 코팅 혼합물은 정제 상에 사용될 수 있으나, 이는 위장에 대한 보호로 의도되는 것은 아니다. 이는 당의정, 또는 정제를 삼키기 쉽게 만드는 코팅을 포함할 수 있다. 캡셀은 무수 치료제(예, 분말)의 전달을 위한 경질 쉘(젤라틴 같은)로 이루어질 수 있고, 액상 형에 대해서 연질 젤라틴 쉘을 사용할 수 있다. 카세의 쉘 재료는 농후 전분 또는 기타 식용 페이퍼일 수 있다. 필제, 로젠지, 성형 정제 또는 정제 연마분인 경우, 습윤공 기술을 사용할 수 있다.

펠티드 치료제는 약 1mm 입자 크기의 과립 또는 펠릿 형태로 미세 다중입자로서 제형중에 포함될 수 있다. 캡셀 투여용 재료의 제형은 또한 산제, 가볍게 압착된 플럭 또는 정제도 될 수 있다. 치료제는 압착에 의해 제조될 수 있다.

색소 및 향미제를 모두 포함할 수 있다. 예를 들면, 단백질(또는 유도체)은 제형화될 수 있고(예를 들면 리포솜 또는 미소구 캡슐화) 이후 식용 제품, 예를 들면 색소 및 향미제를 함유하는 냉장 음료 내에 추가로 함유될 수 있다.

불활성 물질로 치료제의 용적을 희석 또는 증가시킬 수 있다. 이들 희석제는 탄수화물, 특히 만니톨, 락토즈, 무수 락토즈, 셀룰로즈, 슈크로스, 개질 덱스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 특정 무기염을 또한 충전제로 사용할 수 있으며, 여기에는 삼인산칼슘, 탄산 마그네슘 및 염화나트륨을 포함한다. 몇몇 시판 희석제는 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, 엠콤프레스 및 아비셀이다.

붕해제는 치료제를 고체 투여형으로 제형화하는 중에 첨가할 수 있다. 붕해제로 사용되는 물질은 전분을 기본으로 하는 시판 붕해제 엑스플로탭(Explotab)을 포함하는 전분을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 나트륨 전분 글리콜레이트, 엠벌라이트, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈, 울트라밀로펙틴, 알긴산나트륨, 젤라틴, 오렌지 필, 산 카복시메틸 셀룰로즈, 천연 스펀지 및 벤티나이트를 모두 사용할 수 있다. 또다른 형태의 붕해제는 불용성 양이온 교환 수지이다. 분말화된 검을 붕해제 및 결합제로서 사용할 수 있고 이들은 아가, 카라야 또는 트라가칸트와 같은 분말화 검을 포함할 수 있다. 알긴산 및 이의 나트륨 염은 또한 붕해제로서 유용하다. 결합제는 치료제를 한데 결합시켜 경질 정제를 형성하는데 사용할 수 있고

아카시아, 트라가칸트, 전분 및 젤라틴과 같은 천연 산물로부터의 물질을 포함할 수 있다. 기타로는 메틸 셀룰로즈(MC), 에틸 셀룰로즈(EC) 및 카복시메틸 셀룰로즈(CMC)를 포함한다. 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 하이드록시프로필메틸 셀룰로즈(HPMC)가 둘다 알콜 용액중에 사용되어 치료제를 과립화시킬 수 있다.

제형화 과정중에 들러붙는 것을 방지하기 위해 치료제 제형중에 마찰방지제를 포함시킬 수 있다. 윤활제는 치료제와 다이 벽 사이의 층으로서 사용될 수 있고, 이들은 마그네슘 및 칼슘염을 포함하는 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 액체 파라핀, 식물성 오일 및 왁스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 나트륨 라우릴 설페이트, 마그네슘 라우릴 설페이트, 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜(카보락스 4000 및 6000)과 같은 가용성 윤활제를 사용할 수 있다.

제형화 중에 약물의 유동 특성을 증진시키고 가압중 재배열을 보조할 수 있는 활락제를 첨가할 수 있다. 활락제는 전분, 탈크, 발열성 실리카 및 수화 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다.

치료제가 수성 환경 내로 분해되는 것을 돕기위해 계면활성제를 습윤제로서 부가할 수 있다. 계면활성제는 나트륨 라우릴 설페이트, 이옥틸 나트륨 설포석시네이트 및 디옥틸 나트륨 설포네이트와 같은 음이온 세제를 포함할 수 있다. 양이온성 세제가 사용될 수 있으며, 이에는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤제토늄 클로라이드가 포함된다. 계면활성제로서 제형중에 포함될 수도 있는 잠정적 비이온성 세제의 예로는 라우로마크로골 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 경화 캐스터 오일 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 40, 60, 65 및 80, 슈크로즈 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로즈 및 카복시메틸 셀룰로즈이다. 이들 계면활성제는 단백질 또는 유도체의 제형중에 단독으로 또는 상이한 비율의 혼합물로서 존재할 수 있다.

폴리펩티드(또는 유도체)의 흡수를 잠정적으로 증진시킬 수 있는 부가제는 예를들면 지방산 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산이다.

폐 전달

본 발명에서는 또한 폴리펩티드(또는 이의 유도체)의 폐 전달을 고려하고 있다. 폴리펩티드(또는 이의 유도체)는 흡입하는 동안 포유동물의 폐로 전달되어 기포의 점막 표면을 피복하게 된다. 하기 문헌에 이것이 포함되어 있다: Adjei et al., 1990, *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei et al., 1990, *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144(류프롤리드 아세테이트); Braquet et al., 1989, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(suppl.5): 143-146(엔도텔린-1); Hubbard et al., 1989, *Annals of Internal Medicine*, Vol.111, pp206-212(al-안티트립신); Smith et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146(a-1-프로테이나제); Oswein et al., 1990, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, (재조합 사람 성장 호르몬); Debs et al., 1988, *J. Immunol.* 140:3482-3488(인터페론-G 및 종양괴사인자 알파) 및 Plaz et al., US Patent No. 5,284,656(과립구 콜로니 자극 인자). 전신계 효과를 위한 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물에 대해서는 1995년 9월 19일 웡(Wong et al.)에게 허여된 미국 특허 제5,451,569호에 기술되어 있다.

본 발명의 수행을 위해 분무기, 계량된 용량 흡입기, 및 분말 흡입기를 포함하나 이에 제한되지 않는, 치료제의 폐 전달을 위해 고안된 다양한 기계 장치의 사용을 고려할 수 있으며, 이들은 모두 당업계의 숙련자에게 친숙하다.

분무기(제트 또는 초음파)를 사용하기에 적합한 제형은 용액 ml당 생물학적 활성 단백질 약 0.1 내지 25mg 농도로 물에 용해된 폴리펩티드(또는 유도체)를 포함하는 것이 일반적이다. 제형은 또한 완충제 및 단순한 당을 포함할 수 있다(예를 들면 단백질 안정화 및 삼투압 조절을 위해). 분무기용 제형은 또한 에어로졸을 제조하는데 있어 용액의 분무에 의해 야기되는 표면 유도된 단백질의 응집을 방지하거나 감소시키기 위해 계면활성제를 함유할 수도 있다.

계량된 용량 흡입기로 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제의 보조로 추진제중에 현탁되는 폴리펩티드(또는 유도체)를 함유하는 미분 분말을 포함하게 된다. 추진제는 이러한 목적을 위해 사용될 수 있는 통상의 물질, 예를들면, 클로로플루오로카본, 하이드로클로로플루오로카본, 하이드로플루오로카본 또는 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 또는 이의 혼합물을 포함하는 탄화수소이다. 적합한 계면활성제는 솔비탄 트리올리레이트 및 콩 레시틴을 포함한다. 올레산은 계면활성제로서 유용하다.

분말 흡입기로부터 분배하기 위한 제형은 폴리펩티드(또는 유도체)를 함유하는 미분 건조 분말을 포함하게 되며, 또한 락토즈, 솔비톨, 슈크로즈 또는 만니톨과 같은 벌크제를 장치로 부터 분말의 분산을 용이하게 하는 양(예를 들면 제형의 50 내지 90 중량%)으로 포함할 수 있다. 단백질(또는 유도체)은 떨어져 있는 폐로 가장 효율적인 전달을 위해 가장 유리하게는 평균 입자 크기 10mm(또는 마이크로) 미만, 가장 바람직하게는 0.5 내지 5mm의 미립자 형태로 제조해야 한다.

비내 전달

폴리펩티드(또는 유도체)의 비내 또는 인두 전달 또한 고려될 수 있다. 비내 전달로, 폐내 생성물을 침착시킬 필요없이, 코로 치료제를 투여한 후 상부 기도 점막상으로 직접 폴리펩티드를 통과시킬 수 있게 된다. 비내 투여를 위한 제형은 덱스트란 또는 사이클로덱스트란을 포함한다.

하기 실시예는 본 발명의 바람직한 양태를 보다 충분히 설명하기 위해 제시된다. 하지만 이들은 발명의 광범위한 영역을 제한하는 것으로 간주될 수 없다.

실험 상세 부분

실시예 1: 콜린 결합 단백질 A(CbpA)의 펩티드 트룬게이트

CbpA의 트룬게이트화 N-말단 단편(혈청형 4)를 포함하는 폴리펩티드를 생성시킨다. 전체 길이 CbpA는 PCR 프라이머 SJ533 및 SJ537을 사용하여 증폭되고, 프라이머는 CbpA 폴리펩티드의 유도된 N-말단 아미노

산 서열을 기준으로 하여 디자인된다. 5' 전방 프라이머 SJ533= 5' GGC GGA TCC ATG GA(A,G) AA(C,T) GA(A,G) GG 3'. 이러한 변화된 프라이머는 BamHI 및 NcoI 제한 위치 및 ATG 출발 코돈 둘 다를 도입하는 아미노산 서열 XENEG로부터 디자인된다. 3' 역 프라이머 ST537 =5' GCC GTC TTA GTT TAC CCA TTC ACC ATT GGC 3'. 이 프라이머는 클로닝 목적을 위한 SaLL 제한 위치 및 CbpA로부터 천연 중지 코돈을 도입하고, 4 및 R6x 서열의 두 형태를 기본으로 한다.

PCR 생성물은 게놈 DNA로부터 템플레이트로서 어닐링 온도 50°C에서 High Fidelity 효소(베링거 만하임)를 사용하여 30사이클 증폭된 프라이머 SJ533 및 SJ537을 사용하여 생성된다. 생성되는 PCR 생성물은 QIAquich PCR 정제 Kit(Qiagen, Inc.)를 사용하여 정제한 다음, BamHI 및 SaLL 제한 효소를 사용하여 분해하고, BamHI, XbaI 및 SmaI 제한 효소로 분해된 pQE30 발현 벡터(Qiagen, Inc.) 속에 클로닝한다.

폴리펩티드 R2:

제2 반복 영역의 말단에서의 천연 PvuII 위치, 즉 도 1에 도시된 바와 같은 C 영역(타입 4 서열의 핵산 1228)을 이용하여 cbpA 유전자의 절단물화 변형을 생성시킨다. 절단물 클론을 생성시키기 위해, 전체 길이 클론 PM1580(타입 4) 또는 PM1581(R6x)를 PvuII 및 XbaI를 사용하여 분해하고, 생성된 단편을 발현 벡터, pQE30 속에 결합시키고, 적합한 숙주로 변형시킨다. 단백질을 발현시키고 정제한다. 이러한 경우에 발현 벡터에 의해 사용되는 중지 코돈은 인서트가 다운스트리이고, 발현된 단백질은 클로닝화 위치의 5' 말단에서 추가의 핵산으로 인해 인서트의 예상된 크기보다 크다. 폴리펩티드 R2의 아미노산 서열은 SEQ ID NO 1에 나타난다.

폴리펩티드 R1:

유사한 전략을 CbpA의 N-말단 영역 내의 제1 반복 영역, 즉 폴리펩티드 R1의 A 영역만을 발현시키는데 사용한다. 여기서, 2개의 아미노 반복(타입 4 서열의 핵산 856) 사이의 천연 XmnI 위치를 사용한다. cbpA 전체 길이 클론 PM1580은 XmnI 및 AatII를 사용하여 분해한다. 벡터 pQE30은 AatII 및 SmaI를 사용하여 분해한다. 다시 한번 2개의 규격화된 단편을 결합시키고, E. coli로 변형시키고, 클론을 인서트를 위해 스크리닝한다. 하나의 양성 클론을 선택하고, 재조합 단백질을 상기한 열로부터 정제한다.

모든 폴리펩티드를 이콜라이 및 pQE30벡터를 사용하여 Qia Expression System(Qiagen)을 사용하여 발현 및 정제한다. His 태그된 단백질의 아미노 말단을 숙주 및 안티-히스틴 항체 및 단백질 특이 항체를 사용하는 웨스턴 분석을 사용하여 검출한다.

R1 및 R2의 정제

이 콜라이로부터 재조합 단백질을 제조하고 정제하기 위해 단일 콜로니를 재조합 플라스미드를 함유하는 도말된 세균으로부터 선택하고 37°C에서 50ug/ml 카나마이신 및 100ug/ml 암피실린과 함께 LB 완충액 6.0ml중에서 밤새 성장시킨다. 이러한 6.0ml 배양물을 상기 농도의 항체와 함께 1L LB로 가한다. 배양물을 $A_{600} \sim 0.4000$ 이 될 때까지 37°C에서 진탕한다. 1M IPTG를 1L 배양물로 1mM의 최종 농도로 가한다. 이후 배양물을 37°C에서 3 내지 4시간 동안 진탕한다. 1L 배양물을 모델 J-6B 원심분리기에서 4000rpm에서 15분간 회전한다. 상등액을 버리고 펠렛을 -20°C에서 보관한다.

1L 펠렛을 50mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_4$, 10mM Tris, 6M GuCl, 300mM NaCl, pH 8.0(완충액 A) 25ml중에 재현탁시킨다. 이 혼합물을 실온에서 30분간 회전시키고 마이크로 팁을 사용하여 초음파기(VibraCell Sonicator(Sonics and Materials, Inc., Dnabury, CT))를 사용하여 2회, 30초간 50% 큐티 사이클에서 아웃풋 세팅을 7로 하여 초음파분쇄 한다. 혼합물을 JA20 회전기에서 10K에서 5분간 회전시키고 상등액을 제거하여 버린다. 상등액을 Gradifrac System(Pharmacia Biotech, Upsula Sweden)에 부착된 10ml Talon(Clonetech, Palo Alto, CA)수지 컬럼으로 로딩한다. 칼럼은 100ml 완충액 A로 평형화시키고 추가 완충액 200ml로 세척한다. 부피는 100% 50mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_4$, 8M 우레아, 20mM MES를 사용하여 pH 구배를 기초하였으며, 최종 목적 완충액으로서 pH 6.0(완충액 B)은 총 부피 100ml에 걸쳐 실행시킨다. 단백질은 ~30% 완충액 B에서 생성되었다. 생성된 피크를 집적하여 보관한다.

재접충을 위해, 분자량이 14,000인 투석 튜브를 사용하여 약 3시간 동안 실온에서 부피 2L의 PBS로 투석을 수행한다. 이어서 시료를 4°C의 PBS 2L에서 철야 투석한다. 단백질이 농축되는 동안 센트리프레프-30 스피ن(Centriprep-30 spin) 칼럼을 사용하여 PBS에 방사된 보조액을 첨가하고 재방사시킴으로써 추가의 완충 교환을 수행한다. 단백질 농도는 BCA 단백질 분석으로 결정하며 순도는 쿠마지 스테인드 4(Coomassie stained 4)-20% SDS-PAGE 겔(도 3)을 사용하여 가시화한다.

실시예 2: 폴리펩티드 R1과 R2의 렉틴 활성

LNnt는 진핵 세포 상에 존재하는 폐렴구균에 대한 수용체의 탄화수소화물 동족체이다. CbpA 불완전 폐렴구균 돌연변이체는 진핵 세포나 CbpA의 부착 리간드로 알려진 면역화된 당에 부착될 수 없다는 것이 알려져 있다. CbpA는 2개의 영역으로 나눌 수 있는 조절 단백질이다: N-말단 관능성 영역과 C-말단 콜린 부착 영역(도 1). 폴리펩티드 R1과 R2를 완전한 CbpA의 활성이 특이적 N 말단(예 R2)이나 그의 단편(예 R1)에 존재하는 지 여부를 결정하기 위해 생물학적 활성을 분석한다. 단지 N 말단 영역(R2)만이 콜린 결합 부위(CBD) 없이 렉틴 결합을 위한 생물학적 활성을 가지는 지 여부를 판단한다. 이것은 CbpA 총 길이 및 폴리펩티드 R2(프롤린 농축 영역에서 Pvu II 부위 하의 CBD 부위가 손실된 단편)를 사용하여 실험한다.

분석은 CbpA에 의해 인식된다고 알려진 글루코콘주게이트를 사용하여 막 세포 배양 웰(coat tissue culture well)로 행한다: LNnt-알부민, 3' 시알릴 락토스-알부민 및 네가티브 대조 알부민. 이어서 플레이트를 알부민으로 블로킹하고 세척한 후 CbpA 폴리펩티드 R2나 폴리펩티드 R1을 15분에 걸쳐 첨가한 후 (0.8µg/분) 세척없이 R6 폐렴구균으로 라벨화된 플루오레진을 30분에 걸쳐 첨가하고 세척한 후 부착된 박테리아를 눈으로 센다.

어떠한 펩티드의 첨가도 없이 R6을 부착하는 것은 파지티브 대조군이며 이것은 100%(표 1)에서 칼리브레

이전하였다. 3개의 개별적 실험에서, CbpA 총 길이 또는 폴리펩티드 R2는 폐렴구균이 LNnT 코팅 표면에 부착되는 것을 경쟁적으로 저해시킨다. CbpA 총 길이는 71, 64% 및 63%의 대조군으로 저해시킨다: 폴리펩티드 R2는 65%, 53% 및 74%의 대조군으로 저해한다. CbpA 및 R2와 등가의 활성은 콜린 결합 부위에 CbpA의 LNnT 렉틴 활성을 필요로 하지 않으며 R2로 LNnT 렉틴이 우수함을 지시한다.

LNnT에 결합되는 것과는 대조적으로, 폐렴구균을 3' 시알릴 락토스에 부착시키는 것은 총 길이 CbpA(74 및 66%)에 비교된 R2(79 및 101%)로 저해한다. 이것은 CBD가 손실될 때 시알산 인지 활성이 손실됨을 의미한다. 반대로, R1이 시알산 인지에 활성이 있으며 이러한 특성은 CbpA와 공유하나 R2에서는 완전히 감추어진다. 이것은 폴리펩티드를 관능성 영역으로 접충시키는 것이 조성물 및 폴리펩티드의 길이에 영향을 받음을 지시한다. 약간의 서열 변형이 다른 균주에서 발견된다(도 2 참조). R1과 R2 간 서열의 동질성이 높을 때, R1 및 R2 모두 렉틴 활성에 필요하거나 이들이 약간 다른 특성을 갖는 렉틴일 가능성도 있다(±시알산).

[표 1]

용해성 CbpA 형태에 의한 R6 폐렴구균 사이의 정제된 글리코콘쥬게이트에의 부착 저해

Cbp 형태	LNnT		3' 시알릴 락토스	
	단일총 당 폐렴구균 수(SD)	대조군(%)	단일총 당 폐렴구균 수	각 웰 당 대조군(%)
무 펩티드	32822421(489)2210 (350)	100%	26112115(125)	100%
총 길이의 CbpA	20751740(167)1415 (50)	63, 71, 64	19331405(240)	7466
폴리펩티드 R2	24611288(672)1440 (530)	74, 53, 65	26391670(420)	10179
폴리펩티드 R1	30022245(182)2500 (310)	91, 92, 112	10521445(526)	4068

N은 30이며 각 3개 웰의 LNnT를 측정함

N은 20이며 각 3개 웰의 SiL을 측정함

세포 결합 활성과 연관된 렉틴 활성

인간 세포는 탄화수소화물(당단백질 및 당지질)을 포함하는 표면 분자를 포함하며 박테리아는 매우 상이한 단백질 및 지질 골격임에도 불구하고 이러한 탄화수소화물에 의해 글리코코쥬게이트에 부착된다. 그러므로, 생체 내에서 박테리아 활성이 있는 폴리펩티드를 포함하는 박테리아는 인간 세포 표면에 부착될 수 있다. 생체 내에서 렉틴의 활성과 세포 결합 특성 사이의 이러한 직접적 관련성은 폐렴구균에 대해 알려져 있다. 예를 들면 LNnT는 A549 인간의 허파 세포로 활성화된 TNF에 폐렴구균이 부착되는 것을 경쟁적으로 억제하며 시험관 내에서는 폐렴의 진행을 억제시킨다. CbpA 절단 부위의 렉틴 활성이 세포 결합 활성을 반영한다는 것을 확립하기 위해, CbpA 및 절단 부위에 대해 폐렴구균이 허파 세포에 부착되는 것을 억제하는 지에 대해 실험한다(표 2). 총 길이 CbpA 및 폴리펩티드 R2는 각각 58% 및 63%의 대조군에 대해 경쟁적으로 폐렴구균이 허파 세포에 부착되는 것을 억제한다. 폴리펩티드 R1은 유효하지 않으며 이는 R2의 LNnT 결합 활성이 필요함을 나타내며 폐렴구균의 허파 세포에의 결합을 서술한다.

[표 2]

R6 폐렴구균의 TNF 활성화된 인간 허파 세포에의 결합

Cbp 형태	A549 허파	
	단일총 당 폐렴구균 수(평균)	대조군 %
무 펩티드	697, 704, 674702, 722(700)	100%
총 길이 CbpA	376, 431(403)	58%
폴리펩티드 R2	517, 693314, 342, 350(443)	63%
폴리펩티드 R1	696, 642, 552(630)	90%

N은 20이며 각 2 또는 3 웰에서 실험함

R2 의존성 LNnT 렉틴 활성

CbpA의 N-말단 영역은 각 ~110 아미노산의 두개의 반복단위를 포함한다(도 1 참조, 폴리펩티드 R2 내에서의 영역 A 및 C). 두 영역의 생활성 R1에의 상대적 기여도를 연구하기 위해, 영역 A만을 포함하는 것을 R2 및 총 길이 CbpA와 비교한다. 부착도 분석 실험에서, 폴리펩티드 R1은 LNnT에의 부착을 전혀 전하지 못했다(비변형물 91, 92 및 112%). 그러나, 폴리펩티드 R1은 시알릴 락토스에의 부착을 일부 억제함을 나타내었다(대조군 68% 및 40%). 이것은 폴리펩티드 R2가 LNnT 렉틴 활성에 필요하며 R2가 LNnT 렉틴 영역에 우수한 예임을 나타낸다. 반대로, R1은 시알산 인지에 활성적인 것 같다.

CbpA 블록 세포 결합의 N-말단 영역에 대한 항체

CbpA의 N-말단 영역을 세포에 결합시킬 때, N-말단 영역 활성과의 저촉은 박테리아가 세포나 정제된 글리

코콘쥬게이트에 부착되는 것을 억제 또는 방해할 것이다. 이러한 하나의 저축 메카니즘이 항체이다.

[표 3]

항-CbpA R2 항체에 의한 R6 폐렴구균의 LNnT 코팅된 표면에서의 결합 저해

	단일층 당 폐렴구균 수(SD)	대조군 %(평균)
프리뮤네(preImmune) 항체	198(64); 88(4)	100%
R2 절편에 대한 항체	56(11); 9(2)	28%; 10%

희석되지 않은 토끼 항체 $5\mu\text{l} + 2 \times 10^7$ R6 $5\mu\text{l} \times \text{RT}$ 에서 6x30분간 예비 항온 처리한 후 LNnT 코팅된 웰을 부착 분석을 위해 첨가한다. 2개의 다른 실험을 수행한다.

CbpA(R2)의 재조합 N-말단 영역에 부각된 항혈청(antiserum)으로 폐렴구균의 LNnT에의 부착 억제 능력을 시험한다. 토끼 폴리클로날 항 CbpA 항혈청($5\mu\text{l}$) 및 라벨화된 박테리아 2×10^7 $5\mu\text{l}$ 을 실온에서 30분간 항온처리한다. 이 혼합물을 부동성 LNnT 상에 30분간 적가한 후 PBS로 3회 세척하여 결합되지 않은 박테리아를 제거한다. 플레이트에 결합된 박테리아를 현미경으로 세고 결과를 6개 웰로 부터 나온 평균과 표준 편차로 나타낸다. 표 3에 나타난 결과로부터 R2 폴리펩티드에 대해 부각된 항혈청은 폐렴구균이 LNnT에 부착되는 것을 억제함을 알 수 있다. 도 5는 폐렴구균 R6x가 예시된 수용체 LNnT에의 부착 억제를 위한 예비면역물 대 항-CbpA R2 항체의 적정 곡선을 나타낸다. 폐렴구균 부착이 70%를 초과하면 1:100 및 1:200의 희석액에서 항-R2에 의해 저해된다. 또한 1:400으로 희석하면 특이적 효과를 나타내는 활성이 제거된다.

표 3 및 도 5에 제시된 항혈청을 제조하기 위해 사용된 CbpA를 혈청형(serotype) 4로부터 CbpA에 대해 증가시킨다. 부착 억제 분석에 사용된 R6x 균주는 혈청형 2로부터 추출한다. 이중혈청형 박테리아의 부착을 차단하는 상기 항체의 능력은 혈청형에 걸쳐서 교차 보호활성이 있다는 것을 의미한다. 이러한 활성은 효과적인 백신 면역원을 위해 매우 바람직한 활성이다.

CbpA N-말단의 원래 구조에 대한 항체 활성

로즈나우(Rosenow)등의 논문에 기재된 바와 같이, 콜린 친화성 칼럼을 이용하여 CbpA를 천연 숙주 즉 폐렴쌍구균(Pneumococcus)로부터 정제할 수 있다. 다르게는, 폴리히스티딘 꼬리표(tag)를 유전자 끝에 공학적으로 부착시켜 전사된 단백질이 수개의 히스티딘 잔기에 의해 연장되도록 할 수 있다. 이 잔기들은, 보다 짧은 절단가지들(truncates)은 그 천연 구조를 유지하도록 하는 것과는 대조적으로, 전체 길이의 폴리펩티드가 니켈 친화성 매트릭스 정제에 의한 정제를 촉진시킨다. 이러한 생화학적 방법에 의해 특별히 폐렴쌍구균 뿐 아니라 대장균(E.coli) 또는 다른 숙주 박테리아로부터 정제된 CbpA는, 그 천연 구조를 유지한다. 천연적으로 겹친구조인 CbpA는 면역원으로 사용되는 경우에 항체를 생산하는데 이 항체는 다른 방식으로 겹쳐질 수도 있는 절단가지(truncate)로 면역화시켜 유도된 것들과는 잠재적으로 다르다. 마찬가지로, 치료제로 사용된 CbpA는 절단가지와는 다른 구조를 가질 수 있는데 이는 부착을 차단하는 능력을 증진시킬 수 있다. 이러한 사항들을 고려하면, CbpA를 그 천연의 삼차구조로 겹쳐지도록 하는 전체길이 단백질로서 생산하여 C 말단(CBD)을 생화학적으로 절단하는 것이 유리할 수 있다. 예를 들어, 하이드록실아민으로 처리하면, 혈청형 R6x 및 혈청형 4인 콜린 결합 단백질 A의 아미노산 위치 475에서 CbpA가 절단되어 N 말단과 C 말단이 분리될 것이다. 이 N 말단 부분은 치료제 또는 면역원으로서 적절하다.

다르게는, 천연 CbpA는 활성 구조에 대한 면역원 및 항혈청으로 사용될 수 있다. 이 혼합물내의 생활성 항-N-말단 항체는 흡착에 의해 BD에 대한 항체를 제거함으로써 풍부해질 수 있다. 이러한 항체는 200ul의 혈청을 1×10^8 CbpA 결합-박테리아와 함께 R1에서 1시간동안 항온배양하여 제조할 수 있다. 이 변이체상의 다른 콜린 결합 단백질들은 항-CBD 항체를 흡수한 후 원심분리 및 박테리아 제거에 의해 항혈청으로부터 제거된다.

흡수된 항CbpA 항체의 생활성을 증명하기 위해, 폐렴쌍구균이 모델 수용체 LNnT에 부착하는 것을 차단하는 흡수된 항혈청의 능력을 측정하였다. R6x 폐렴쌍구균을 1:600 희석한 항혈청과 항온배양한 후 LNnT 알부민으로 코팅된 웰(well)에 넣었다.

[표 4]

흡수된 항 CbpA 항혈청의 부착 차단

항혈청(1:600)	웰당 폐렴쌍구균 수 \pm SD (제어 %)
항체 없음	563 ± 11 (100%)
전-면역(preImmune) 항체	479 ± 11 (85%)
항 CbpA 항혈청	294 ± 72 (52%)
CBD 항체 제거를 위해 흡수된 항 CbpA 항혈청	175 ± 38 (31%)

이러한 결과는 천연구조로 있는 Cbp/AdmI N 말단 영역에 대한 항체가 부착을 강하게 차단한다는 것을 의미한다. 이러한 활성은 1:600 희석에서 불활성인 도5의 절단가지 활성보다 큰 것이다. 흡수된 항 CbpA 항혈청의 이러한 활성은 도5의 적정 연구에 의해 더욱 증명된다. 폐렴쌍구균 4형이 LNnT-코팅된 웰로의 기저선 부착은 삼각형으로 표시된다. 폐렴쌍구균과 비흡수된(사각형) 또는 흡수된(마름모형) 항혈청을 다양한 희석에서 전-배양(pre-incubation)한 결과는 부착의 감소를 얻었다는 것을 의미한다. 두 항혈청이 부착에 있어서 유사한 감소를 보였다는 사실은 CbpA에 대한 항체의 차단활성의 대부분이 N-말단에 존재한

다는 것을 증명해준다(즉 흡수에 의해 콜린 결합 영역으로 항체를 제거하는(옮기는) 것이 생활성을 감소시키지 않는다).

실시예 3 : 항-R2 항혈청을 이용한 수동 보호

토끼의 면역항체 생성

폴리펩티드 R2(CbpA 절단가지) 및 CbpA에 대한 토끼의 면역 항체가 코반스(덴버, 펜실바니아)에서 생산되었다. 전-면역 항체를 수집한 후, 양 아미노산 말단 반복부위(제조 483:58 상기)를 함유하는, 컴플리트 프레운드 애주번트(Complete Freund's Adjuvant)중의 R2 250ug을 뉴질랜드 흰 토끼에 면역화하였다. 이 토끼에 인컴플리트 프레운드 애주번트(Incomplete Freund's Adjuvant)중의 R2 125ug 증대량을 21일째에 주입하고 31일째에 채혈하였다. 마찬가지로 두번째 토끼를 정제된 CbpA로 면역화하였다.

마우스에서의 수동 보호

1:2 희석한 토끼 항 R2 또는 멸균 PBS (예비-면역 및 31일 면역 혈청)상태의 전-면역 혈청 100ul를 C3H/HeJ 마우스(5/그룹) 복강내로 수동적으로 면역화하였다. 혈청 투여 1시간 후에, 1600CFU *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 6B(SP317균주)를 마우스에 접종하였다. 14일동안 마우스 생존을 모니터링하였다. 폴리펩티드 R2에 대한 토끼의 면역 혈청으로 면역화시킨 마우스의 80%가 생존하였다(도4). 전-면역토끼 혈청으로 면역화한 마우스는 모두 7일내에 사망하였다.

이 데이터는, CbpA 특이적 항체는 전신성 폐렴쌍구균 감염을 보호한다는 것을 보여준다. 또한, 이 데이터는 콜린-결합 부위가 보호에 필수적인 것이 아니라는 것을 보여주는데, 왜냐하면 콜린 결합 반복부 보존성이 없는 절단가지 단백질인 폴리펩티드 R2에 특이적인 항체도 보호에 충분했기 때문이다. 또한, 혈청형 4의 CbpA에 대한 혈청은 혈청형 6B 접종에 대한 보호효과를 보였다.

실시예 4 : 항-R1 항혈청을 이용한 능동 보호

CbpA 절단가지 단백질 R1(50ug PBS중의 15ug, 더하기 50ul의 컴플리트 프레운드 애주번트)을 C3H/HeJ 마우스(10마리/그룹) 복강내에 투여하여 면역화하였다. 10마리의 위(sham)-면역화한 마우스 그룹에 PBS와 애주번트를 투여하였다. 4주후에, 15ug 단백질과 인컴플리트 프레운드 애주번트(IFA)로 복강을 통해 두번째 면역화를 실시하였다(PBS와 IFA를 투여한 위면역화). 3, 6 및 9주째에 채혈(반게도 채혈)하여 면역반응 분석을 하였다. 9주째에 CbpA 면역화 마우스 10마리로부터 얻은 혈청의 ELISA 종말점 항-CbpA 절단가지 역가는 4,096,000이었다. 위-면역화 마우스로부터 얻은 혈청에서는 항체가 검출되지 않았다. 10주째에 560 CFU *Streptococcus pneumoniae* 혈청형 6B (SPSJ2P균주, 테네시주 멤피스의 성 주드 아동 병원의 피. 프플린이 제공함)로 마우스를 접종하였다. 14주동안 마우스의 생존을 모니터링하였다. CbpA 절단가지 단백질 R1으로 면역화한 마우스의 80%가 생존하였다. 위-면역화한 마우스는 모두 8일내에 사망하였다(도7).

이 데이터는, CbpA 재조합 절편으로 면역화하면 전신성 폐렴쌍구균 감염 및 사망을 보호할 수 있는 특이적 항체의 생산을 유도한다는 것을 증명해준다. 또한 이데이터는 콜린-결합 부위가 보호에 필수적인 것이 아니라는 것을 보여주는데, 왜냐하면 사용된 면역원이 절단가지 단백질 R1이기 때문이다. 또한, 이 결과는 보호 반응을 유도하는데 있어서 단일의 아미노산 말단 반복부만으로도 충분할 수 있다는 것을 시사한다. 교차 보호효과 역시 증명되었는데, 혈청형 4 DNA 서열에 기초하여 재조합 폐렴쌍구균 단백질이 생성되었고 혈청형 6B 단리물로 접종한 후에 보호효과가 관찰되었기 때문이다.

실시예 5 : 새끼 랫트에서 비인두에 콜로니형성 예방

시험관내에서, CbpA의 N-말단 영역은 폐렴쌍구균 부착을 경쟁적으로 억제하였다. 이러한 활성을 갖는 펩티드의 치료 유용성을 증명하기 위하여, 새끼 랫트에 절단가지 펩티드를 투여한 후 폐렴쌍구균을 접종한 후 비인두에 있는 콜로니를 측정하였다.

0.8ug의 폴리펩티드 R2 또는 R1을 함유하거나 또는 단백질을 함유하지 않는 10ul의 PBS를 랫트 비강내로 투여하였다. 15분후에, 3형 폐렴쌍구균(S111 균주)(1×10^5 cfer를 함유하는 10ul)을 비강내로 도입하였다. 폐렴쌍구균의 부착 및 콜로니형성을 경쟁적으로 억제하는 폴리펩티드의 능력을 측정하기 위하여, 72시간 후에 비강세척을 한 후 발견되는 폐렴쌍구균 수를 그룹당 각 4마리에 대하여 정량하였다. S111만을 투여 받은 랫트는 10ul 당 2200, 6500, 6900 및 8700(평균 6075)의 콜로니수를 보였다. 절단가지 R2로 처리한 동물이 가장 박테리아수 감소를 보였는데(3600, 3500, 2500, 2100) 평균이 10ul 당 2925이었다. 절단가지 R1으로 처리한 동물 역시 콜로니형성의 감소(5000, 4800, 3500, 1600)를 보였는데 그 평균이 3725(제어 61%)이었다.

이 실험은, 본발명의 펩티드를 치료연구고안 동물에 투여하면 그 후의 폐렴쌍구균 접종에 대해 보호효과를 갖는다는 것을 보여준다.

논의

실험에 의해 증명된 바와 같이, 폴리펩티드 R2는, 1)백신으로서 투여되는 경우에 보호 항체를 유도하므로 백신제제로서 바람직한 조성물이고; 2)펩티드로서 호흡기 및/또는 비인두 수용체에 전달되는 경우, 폐렴쌍구균의 부착을 경쟁적으로 방지하므로 콜로니형성 또는 침입성 질환에 대한 예방 및 치료제로 바람직한 조성물이다. 또한, CbpA 절단가지는 CBD 없이 백틴으로서 기능한다. 두개의 탄수화물이 인식되는데: 양 N-말단 반복부(A 및 C)를 함유하는 펩티드에 의한 L₁NnT인식(도1)과 단일 N-최말단 반복부(A)만을 함유하는 펩티드에 의한 시알산이다. N-말단 반복부를 포함하는 절단가지인 폴리펩티드 R1 및 R2 또한 세포배양 분석에서 렉틴활성을 보인다.

폴리펩티드 R2 활성의 중요한 특성은, 1) 동물모델의 폐세포에 있는 정제된 글리코뉴클레오티드 수용체의 인식을 위해 폴리펩티드 R2 및 전체길이 CbpA 생활성의 완전한 상관관계 특성으로 상관관계는 이들에 대한 항체에서도 보여진다. 2) 다른 혈청형(예, 6B 및 2)을 이용한 시험관내 시험에서 4형 유도 물질과 박테리아간의 교차 보호 특성으로 이는 유용한 백신, 예방 및 치료모델에 있어서 중요하다.

본 발명은 여기서 다양한 구체적인 물질, 방법 및 실시예에 의해 참조로 예시되고 설명되었으나, 본 발명은 이러한 특정 물질 및 그 조합 및 이러한 목적을 위해 선택된 방법에 국한되지 않는 것으로 이해된다. 이러한 세부사항의 다양한 변화는 당업자에 의해 인식될 수 있을 것이다. 마찬가지로, 여기서 인용하여 어떠한 참고문헌도 본발명의 개시와 관련되는 한도에서 여기에 기재된것으로 간주되어야 한다.

[서열 목록]

- <110> St. Jude Children's Research Hospital; Medimmune, Inc.
- <120> POLYPEPTIDE COMPRISING THE AMINO ACID OF AN N-TERMINAL CHOLINE BINDING
PROTEIN A TRUNCATE, VACCINE DERIVED THEREFROM AND USES THEREOF
- <130> 5-2000-045336-1; 5-2000-043861-8
- <140> 60/080,878
- <141> 1998-04-07
- <140> 09/056,019
- <141> 1998-04-07
- <160> 39
- <170> KOPATIN 1.5

<210> 1

<211> 406

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 1

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1 5 10 15

Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu

20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val

35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val

50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys

65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu

85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser

100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp

115 120 125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu

130 135 140

Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys

145 150 155 160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu

	165	-170	175
Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu			
	180	185	190
Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys			
	195	200	205
Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu			
	210	215	220
Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg			
	225	230	235
Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg			
	245	250	255
Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala			
	260	265	270
Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser			
	275	280	285
Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu			
	290	295	300
Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr			
	305	310	315
			320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

325 330 335

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

340 345 350

Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu

355 360 365

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg

370 375 380

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys

385 390 395 400

Val Lys Glu Lys Pro Ala

405

<210> 2

<211> 655

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 2

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1 5 10 15

Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu

20	25	30	
Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val			
35	40	45	
Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val			
50	55	60	
Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys			
65	70	75	80
Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu			
85	90	95	
Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser			
100	105	110	
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp			
115	120	125	
Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu			
130	135	140	
Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys			
145	150	155	160
Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu			
165	170	175	

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu
 180 185 190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys
 195 200 205

Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 210 215 220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg
 225 230 235 240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg
 245 250 255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala
 260 265 270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu
 290 295 300

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr
 305 310 315 320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp
 325 330 335

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

340 345 350

Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu

355 360 365

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg

370 375 380

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys

385 390 395 400

Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys

405 410 415

Ala Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln

420 425 430

Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala

435 440 445

Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro

450 455 460

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys

465 470 475 480

Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala

485

490

495

Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn
 500 505 510

Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr
 515 520 525

Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly
 530 535 540

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu
 545 550 555 560

Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala
 565 570 575

Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn
 580 585 590

Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr
 595 600 605

Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser
 610 615 620

Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr
 625 630 635 640

Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
 645 650 655

<210> 3

<211> 284

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn
 1 5 10 15

Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu
 20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val
 35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val
 50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys
 65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu
 85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser

100	105	110	
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp			
115	120	125	
Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu			
130	135	140	
Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys			
145	150	155	160
Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu			
	165	170	175
Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu			
	180	185	190
Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys			
	195	200	205
Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu			
	210	215	220
Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg			
225	230	235	240
Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg			
	245	250	255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala

260

265

270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu

275

280

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala

1

5

10

15

Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro

20

25

30

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val

35

40

45

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu

50

55

60

Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser

65

70

75

80

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys

85

90

95

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala

100

105

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 5

Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu

1

5

10

15

Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

20

25

30

Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

35

40

45

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn

50

55

60

Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu

65

70

75

80

Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg

85

90

95

Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala

100

105

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6

Lys Xaa Xaa Glu

1

<210> 7

<211> 376

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys

1

5

10

15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu

20

25

30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn

35

40

45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg
 50 55 60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr
 85 90 95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu
 100 105 110

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr
 115 120 125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp
 130 135 140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys
 145 150 155 160

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu
 165 170 175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg
 180 185 190

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys

195	200	205	
Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala			
210	215	220	
Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn			
225	230	235	240
Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser			
245	250	255	
Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val			
260	265	270	
Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg			
275	280	285	
Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu			
290	295	300	
Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu			
305	310	315	320
Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys			
325	330	335	
Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr			
340	345	350	

Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu
 355 360 365

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala
 370 375

<210> 8

<211> 663

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys
 1 5 10 15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu
 20 25 30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn
 35 40 45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg
 50 55 60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu
 65 70 75 80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr

85	90	95
Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu		
100	105	110
Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr		
115	120	125
Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp		
130	135	140
Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys		
145	150	155
160		
Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu		
165	170	175
Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg		
180	185	190
Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys		
195	200	205
Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala		
210	215	220
Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn		
225	230	235
240		

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser
 245 250 255

Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val
 260 265 270

Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg
 275 280 285

Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu
 290 295 300

Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu
 305 310 315 320

Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys
 325 330 335

Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr
 340 345 350

Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu
 355 360 365

Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala
 370 375 380

Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln
 385 390 395 400

Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu Asp Tyr Ala

405 410 415

Arg Arg Ser Glu Glu Glu Tyr Asn Arg Leu Thr Gln Gln Gln Pro Pro

420 425 430

Lys Thr Glu Lys Pro Ala Gln Pro Ser Thr Pro Lys Thr Gly Trp Lys

435 440 445

Gln Glu Asn Gly Met Trp Tyr Phe Tyr Asn Thr Asp Gly Ser Met Ala

450 455 460

Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn

465 470 475 480

Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr

485 490 495

Leu Asn Ala Asn Gly Ser Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly

500 505 510

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Leu

515 520 525

Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ser Asn Gly Ala Met Ala

530 535 540

Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn

545 550 555 560

Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Asn Asn Gly Ser Trp Tyr Tyr
 565 570 575

Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Leu Gln Tyr Asn Gly
 580 585 590

Ser Trp Tyr Tyr Leu Asn Ala Asn Gly Asp Met Ala Thr Gly Trp Val
 595 600 605

Lys Asp Gly Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Glu Ala Ser Gly Ala Met Lys
 610 615 620

Ala Ser Gln Trp Phe Lys Val Ser Asp Lys Trp Tyr Tyr Val Asn Gly
 625 630 635 640

Ser Gly Ala Leu Ala Val Asn Thr Thr Val Asp Gly Tyr Gly Val Asn
 645 650 655

Ala Asn Gly Glu Trp Val Asn
 660

<210> 9

<211> 254

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys

5 10 15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu

20 25 30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn

35 40 45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg

50 55 60

Glu Leu Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Asp Glu Leu Pro Ser Glu

65 70 75 80

Ile Lys Ala Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Lys Phe Lys Lys Asp Thr

85 90 95

Leu Lys Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu

100 105 110

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr

115 120 125

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp

130 135 140

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

145 150 155 160

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu

165 170 175

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg

180 185 190

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala Lys Leu Lys

195 200 205

Glu Ala Asn Val Ala Thr Ser Asp Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala

210 215 220

Lys Arg Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn

225 230 235 240

Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu

245 250

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 10

Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala

1 5 10 15

Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro

20

25

30

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val

35

40

45

Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu

50

55

60

Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser

65

70

75

80

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys

85

90

95

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala

100

105

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 11

Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys

1

5

10

15

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr

20 25 30

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Phe Asp Val Lys

35 40 45

Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser

50 55 60

Arg Asn Glu Gly Thr Ile Lys Gln Ala Lys Glu Lys Val Glu Ser Lys

65 70 75 80

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys

85 90 95

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Asp Ala

100 105

<210> 12

<211> 1219

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 12

gagaacgagg gagctaccca agtaccact tcttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60
 gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
 gaggaatatg taataaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
 acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240

atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300
 gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt cttcgtcaag ttcagactct 360
 tccactaaac cggaaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
 aaggtagcag aagctaagaa gaaggtttaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
 gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccatt acttacaata cgcttgaact tgaattgct 540
 gagtccgatg tggaaagtta aaaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
 cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcgggag ttgagagtaa acaagctgag 660
 gctacaaggt taaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720
 agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aaggggcggg caaaacgagg agttcctgga 780
 gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt 840
 gaagaaactc ttccaagccc atccctgaaa ccagaaaaaa aggtagcaga agctgagaag 900
 aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac 960
 ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt gaaattgctg agtccgatgt ggaagttaa 1020
 aaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa gctaaggaa ctcgaaacga ggaaaaagtt 1080
 aagcaagcaa aagcggaggt tgagagtaaa aaagctgagg ctacaagggt agaaaaaatc 1140
 aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa 1200
 gttaaagaaa aaccagctg 1219

<210> 13

<211> 1969

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 13

gagaacgagg gagctaccca agtaccactt ttttctaat gggcaaatga aagtcaggca 60
 gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
 gaggaatatg taaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
 acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240
 atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300

gtagatgaag ctgtgcttaa gtttgaag gactcatctt cttcgtcaag ttcagactct 360
 tccactaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
 aaggtagcag aagctaagaa gaaggctgaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
 gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccact acttacaata cgcttgaact tgaattgct 540
 gagtccgatg tggaaagttaa aaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
 cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggag ttgagagtaa acaagctgag 660
 gctacaaggt taaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720
 agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aagggcggg caaacgag agttcctgga 780
 gagctagcaa cacctgataa aaaagaaat gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt 840
 gaagaaactc ttccaagccc atccctgaaa ccagaaaaa aggtagcaga agctgagaag 900
 aaggctgaag aagctaagaa aaaagcggag gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac 960
 ccaaccaata cttacaatac gcttgaactt gaaattgctg agtccgatgt ggaagttaa 1020
 aaagcggagg cttgaactag taaagagga agctaaggaa cctcgaacg aggaaaaagt 1080
 taagcaagca aaagcggag ttgagagtaa aaaagctgag gctacaaggt tagaaaaat 1140
 caagacagat cgtaaaaaag cagaagaaga agctaacga aaagcagcag aagaagataa 1200
 agttaagaa aaaccagctg aacaaccaca accagcggc gctccaaag cagaaaaacc 1260
 agtccagct ccaaaaccag agaatccagc tgaacaacca aaagcagaaa aaccagctga 1320
 tcaacaagct gaagaagact atgctcgtag atcagaagaa gaatataatc gcttgactca 1380
 acagcaaccg ccaaaaactg aaaaaccagc acaaccatct actcaaaaa caggctggaa 1440
 acaagaaaac ggtatgtggt acttctaca tactgatggt tcaatggcga caggatggct 1500
 ccaaaacaat ggctcatggt actacctcaa cagcaatggc gctatggcga caggatggct 1560
 ccaaaacaat ggctcatggt actatctaaa cgctaaggt tcaatggcaa caggatggct 1620
 ccaaaacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaaggt tcaatggcga caggatggct 1680
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaaggt tcaatggcga caggatggct 1740
 ccaatacaat ggctcatggt actacctaaa cgctaaggt gatatggcga caggatggct 1800
 gaaagatgga gatacctggt actatcttga agcatcaggt gctatgaaag caagccaatg 1860
 gttcaagta tcagataaat ggtactatgt caatggctca ggtgcccttg cagtcaacac 1920
 aactgtagat ggctatggag tcaatgcaa tggatgatgg gtaactaa 1969

<210> 14

<211> 853

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 14

gagaacgagg gagctaccca agtaccact tcttctaata gggcaaatga aagtcaggca 60
 gaacaaggag aacaacctaa aaaactcgat tcagaacgag ataaggcaag gaaagaggtc 120
 gaggaatatg taaaaaaaaat agtgggtgag agctatgcaa aatcaactaa aaagcgacat 180
 acaattactg tagctctagt taacgagttg aacaacatta agaacgagta tttgaataaa 240
 atagttgaat caacctcaga aagccaacta cagatactga tgatggagag tcgatcaaaa 300
 gtagatgaag ctgtgtctaa gtttgaaaag gactcatctt ctctgcaag ttcagactct 360
 tccactaaac cggaagcttc agatacagcg aagccaaaca agccgacaga accaggagaa 420
 aaggtagcag aagctaagaa gaaggtttaa gaagctgaga aaaaagccaa ggatcaaaaa 480
 gaagaagatc gtcgtaacta cccaaccatt acttacaana cgcttgaact tgaattgct 540
 gagtccgatg tggaaagttaa aaaagcggag cttgaactag taaaagttaa agctaacgaa 600
 cctcgagacg agcaaaaaat taagcaagca gaagcggag ttgagagtaa acaagctgag 660
 gctacaaggt taaaaaaaaat caagacagat cgtgaagaag cagaagaaga agctaaacga 720
 agagcagatg ctaaagagca aggtaaacca aagggcggg caaaacgagg agtccctgga 780
 gagctaagca cacctgataa aaaagaaaat gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt 840
 gaagaaactc ttc 853

<210> 15

<211> 318

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 15

aaaccagaaa aaaaggtagc agaagctgag aagaaggttg aagaagctaa gaaaaagcc 60

gaggatcaaa aagaagaaga tgcgcgtaac tacccaacca atacttacia aacgcttgaa 120
 cttgaaattg ctgagtcgga tctgggaagt aaaaaagcgg agcttgaact agtaaaagag 180
 gaagctaagg aacctcgaaa cgaggaaaaa gtttaagcaag caaaagcggg agttgagagt 240
 zaaaaagctg aggctacaag gtttagaaaa atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300
 gaagctaac gaaaagca 318

<210> 16

<211> 327

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 16

acagaaccag gagaaaaggt agcagaagct aagaagaagg ttgaagaagc tgagaaaaaa 60
 gcccaaggatc aaaaagaaga agatcgtcgt aactacccaa ccattactta caaaacgctt 120
 gaacttgaaa ttgctgagtc cgatgtggaa gttaaaaaag cggagcttga actagtaaaa 180
 gtgaaagcta acgaacctcg agacgagcaa aaaattaagc aagcagaagc ggaagttgag 240
 agtaacaag ctgaggctac aaggttaaaa aaaatcaaga cagatcgtga agaagcagaa 300
 gaagaagcta aacgaagagc agatgct 327

<210> 17

<211> 1129

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 17

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tgttgagggg gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa cgttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240

ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaagggt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctaccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420
 gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
 gaggctacaa ggttagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
 aagggggggg caaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaa 720
 gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc ttccaagctc atccctgaaa 780
 tcaggaaaaa aggtagcaga agctgagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagccaag 840
 gatcaaaaag agaagatcg ccgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacctt 900
 gaaattgctg agtccgatgt gaaagttaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 960
 gctaaggaa ctcgagacga ggaaaaaatt aagcaagcaa aagcgaaggt tgagagtaaa 1020
 aaagctgagg ctacaaggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080
 gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gttaaagaaa aaccagctg 1129

<210> 18

<211> 1992

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 18

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tgttgaggga gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aatgtcgc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa tgttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240
 ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaagggt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctaccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaaatt 420

gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
 gaggctacaa ggttagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
 aaggggaggg caaaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaa 720
 gatgcygaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc tccaagctc atccctgaaa 780
 tcaggaaaaa aggtagcaga agctgagaag aaggttgaag aagctgagaa aaaagccaag 840
 gatcaaaaag aagaagatcg ccgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgacctt 900
 gaaattgctg agtccgatgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaaactagt aaaagaggaa 960
 gctaaggaac ctcgagacga ggaaaaaatt aagcaagcaa aagcgaagct tgagagtaaa 1020
 aaagctgagg ctacaagggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 1080
 gctaaacgaa aagcagcaga agaagataaa gctaaagaaa aaccagctga acaaccacaa 1140
 ccagcgcggg ctactcaacc agaaaaacca gctccaaaac cagagaagcc agctgaacaa 1200
 ccaaaagcag aaaaaacaga tgatcaacaa gctgaagaag actatgctcg tagatcagaa 1260
 gaagaatata atcgcttgac tcaacagcaa ccgcaaaaa ctgaaaaacc agcacaacca 1320
 tctactccaa aaacaggctg gaaacaagaa aacggtatgt ggtacttcta caatactgat 1380
 ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactatct aaacgctaat 1440
 ggtgctatgg cgacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactatct aaacgctaat 1500
 ggttcaatgg caacaggatg gctccaaaac aatggttcat ggtactacct aaacgctaat 1560
 ggtgctatgg cgacaggatg gctccaaatc aatggttcat ggtactacct aaacagcaat 1620
 ggcgctatgg cgacaggatg gctccaaatc aatggttcat ggtactacct caacgctaat 1680
 ggtgatatgg cgacaggatg gctccaaaac aacggttcat ggtactacct caacgctaat 1740
 ggtgatatgg cgacaggatg gctccaaatc aacggttcat ggtactacct caacgctaat 1800
 ggtgatatgg cgacaggatg ggtgaaagat ggagatacct ggtactatct tgaagcatca 1860
 ggtgctatga aagcaagcca atggttcaaa gtatcagata aatggtacta tgtcaatggc 1920
 tcagggtgcc ttgcagtcaa cacaactgta gatggctatg gagtcaatgc caatggtgaa 1980
 tgggtaaaact aa 1992

<210> 19

<211> 763

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 19

gaaaacgaag gaagtaccca agcagccact tcttctaata tggcaaagac agaacatagg 60
 aaagctgcta aacaagtcgt cgatgaatat atagaaaaaa tgttgaggga gattcaacta 120
 gatagaagaa aacataccca aaatgtcgcc ttaaacataa agttgagcgc aattaaaacg 180
 aagtatttgc gtgaattaaa tgttttagaa gagaagtcga aagatgagtt gccgtcagaa 240
 ataaaagcaa agttagacgc agcttttgag aagtttaaaa aagatacatt gaaaccagga 300
 gaaaaggtag cagaagctaa gaagaaggtt gaagaagcta agaaaaaagc cgaggatcaa 360
 aaagaagaag atcgtcgtaa ctacccaacc aatacttaca aaacgcttga acttgaatt 420
 gctgagttcg atgtgaaagt taaagaagcg gagcttgaac tagtaaaaga ggaagctaaa 480
 gaatctcgaa acgagggcac aattaagcaa gcaaaagaga aagttgagag taaaaaagct 540
 gaggtacaaa ggttagaaaa catcaagaca gatcgtaaaa aagcagaaga agaagctaaa 600
 cgaaaagcag atgctaagtt gaaggaagct aatgtagcga cttcagatca aggtaaacca 660
 aaggggcggg caaacgagg agttcctgga gagctagcaa cacctgataa aaaagaaaat 720
 gatgcgaagt cttcagattc tagcgtaggt gaagaaactc ttc 763

<210> 20

<211> 318

<212> DNA

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 20

aaatcaggaa aaaaggtagc agaagctgag aagaaggttg aagaagctga gaaaaaagcc 60
 aaggatcaaa aagaagaaga tcgccgtaac tacccaacca atacttaca aacgcttgac 120
 cttgaaattg ctgagtcgga tgtgaaagtt aaagaagcgg agcttgaact agtaaaagag 180
 gaagctaagg aacctcgaga cgaggaaaaa attaaagcaag caaaagcgaag agttgagagt 240

aaaaaagctg aggetacaag gttagaaaac atcaagacag atcgtaaaaa agcagaagaa 300
 gaagctaaac gaaaagca 318

<210> 21

<211> 321

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 21

ccaggagaaa aggtagcaga agctaagaag aaggttgaag aagctaagaa aaaagccgag 60
 gatcaaaaag aagaagatcg tcgtaactac ccaaccaata cttacaaaac gcttgaactt 120
 gaaattgctg agttcgtgt gaaagttaaa gaagcggagc ttgaactagt aaaagaggaa 180
 gctaaagaat ctcgaaacga gggcacaatt aagcaagcaa aagagaaagt tgagagtaaa 240
 aaagctgagg ctacaaggtt agaaaacatc aagacagatc gtaaaaaagc agaagaagaa 300
 gctaaacgaa aagcagatgc t 321

<210> 22

<211> 121

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 22

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys
 1 5 10 15

Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg
 20 25 30

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala

35

40

45

Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu

50

55

60

Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala

65

70

75

80

Glu Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys

85

90

95

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu

100

105

110

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala

115

120

<210> 23

<211> 122

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 23

Pro Ser Ser Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys

1

5

10

15

Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu Asp

20

25

30

Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile

35

40

45

Ala Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys

50

55

60

Glu Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys

65

70

75

80

Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile

85

90

95

Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala

100

105

110

Glu Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Arg Ala

115

120

<210> 24

<211> 428

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 24

Glu Asn Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn

1

5

10

15

Glu Ser Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu
 20 25 30

Arg Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val
 35 40 45

Gly Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val
 50 55 60

Ala Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys
 65 70 75 80

Ile Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu
 85 90 95

Ser Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser
 100 105 110

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp
 115 120 125

Thr Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu
 130 135 140

Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys
 145 150 155 160

Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu
 165 170 175

Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu
 180 185 190

Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys
 195 200 205

Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 210 215 220

Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg
 225 230 235 240

Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg
 245 250 255

Gly Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala
 260 265 270

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu
 290 295 300

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr
 305 310 315 320

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp

	325		330		335										
Val	Glu	Val	Lys	Lys	Ala	Glu	Leu	Glu	Leu	Val	Lys	Glu	Glu	Ala	Lys
	340		345		350										
Glu	Pro	Arg	Asn	Glu	Glu	Lys	Val	Lys	Gln	Ala	Lys	Ala	Glu	Val	Glu
	355		360		365										
Ser	Lys	Lys	Ala	Glu	Ala	Thr	Arg	Leu	Glu	Lys	Ile	Lys	Thr	Asp	Arg
	370		375		380										
Lys	Lys	Ala	Glu	Glu	Glu	Ala	Lys	Arg	Lys	Ala	Ala	Glu	Glu	Asp	Lys
	385		390		395										400
Val	Lys	Glu	Lys	Pro	Ala	Glu	Gln	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Lys
	405		410		415										
Ala	Glu	Lys	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Lys	Pro	Glu	Asn				
	420		425												

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 25

ggcggatcca tggaraayga rgg

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 26

gccgctcgact tagtttaccc attcaccatt ggc

33

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 27

Xaa Glu Asn Glu Gly

1 5

<210> 28

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 28

Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys

1 5 10 15

Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ala Asn Lys Ser

20 25 30

Gln Thr Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Lys
 35 40 45

Lys Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Val Ser Lys Lys Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala
 85 90 95

Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr
 100 105 110

Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala
 115 120 125

Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Leu Arg Asn Tyr Pro
 130 135 140

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ile Ala Glu Ser Asp Val
 145 150 155 160

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu
 165 170 175

Ser Arg Asp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Asn

180	185	190
Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu		
195	200	205
Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Leu Gln Glu Ala		
210	215	220
Asn Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg		
225	230	235 240
Glu Val Xaa Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala		
245	250	255
Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser		
260	265	270
Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu		
275	280	285
Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr		
290	295	300
Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp		
305	310	315 320
Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys		
325	330	335

Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Val Lys Ala Lys Val Glu

340

345

350

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg

355

360

365

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala Glu Glu Asp

370

375

380

Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro

385

390

395

400

Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro Ala Pro

405

410

415

Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Lys Pro Lys Ala Glu Lys Pro

420

425

430

Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu

435

<210> 29

<211> 437

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 29

Ala Val Ala Ser Leu Phe Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys

1	5	10	15
Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Lys Ser	20	25	30
Gln Thr Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Lys	35	40	45
Lys Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu	50	55	60
Leu Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser	65	70	75
Val Ser Lys Lys Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala	85	90	95
Lys Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr	100	105	110
Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala	115	120	125
Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Leu Arg Asn Tyr Pro	130	135	140
Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ile Ala Glu Ser Asp Val	145	150	155
			160

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu
 165 170 175

Ser Arg Asp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Asn
 180 185 190

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu
 195 200 205

Lys Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Leu Gln Glu Ala
 210 215 220

Asn Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg
 225 230 235 240

Glu Val Leu Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala
 245 250 255

Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser
 260 265 270

Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu
 275 280 285

Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr
 290 295 300

Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp
 305 310 315 320

Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys

325

330

335

Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Val Lys Ala Lys Val Glu

340

345

350

Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg

355

360

365

Lys Lys Ala Glu Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Ala Glu Glu Asp

370

375

380

Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro

385

390

395

400

Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro Ala Pro

405

410

415

Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Lys Pro Lys Ala Glu Lys Pro

420

425

430

Ala Asp Gln Gln Ala

435

<210> 30

<211> 439

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 30

Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu
1 5 10 15

Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu
20 25 30

Ser Gln Ala Gly His Arg Lys Ala Ala Glu Gln Phe Asp Glu Tyr Ile
35 40 45

Lys Thr Met Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Phe Ala
50 55 60

Leu Asn Ile Lys Leu Ser Arg Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Leu
65 70 75 80

Asn Val Leu Glu Glu Lys Ser Lys Ala Glu Leu Pro Ser Glu Thr Lys
85 90 95

Lys Glu Ile Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Asn Arg
100 105 110

Thr Lys Lys Thr Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys
115 120 125

Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn Tyr Pro Thr
130 135 140

290

295

300

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala
 305 310 315 320

Glu Ser Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu
 325 330 335

Glu Ala Lys Glu Ser Arg Asn Glu Glu Lys Val Asn Gln Ala Lys Ala
 340 345 350

Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys
 355 360 365

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu
 370 375 380

Glu Asp Lys Val Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro
 385 390 395 400

Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu Asn Pro Ala Pro
 405 410 415

Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Thr
 420 425 430

Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 435

<210> 31

<211> 419

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 31

Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn
 1 5 10 15

Glu Gly Thr Thr Gln Ala Pro Thr Ser Ser Asn Arg Gly Asn Glu Ser
 20 25 30

Gln Ala Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Glu
 35 40 45

Lys Met Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu
 50 55 60

Leu Thr Lys Leu Gly Ala Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Arg Gly Leu Ser
 65 70 75 80

Val Ser Lys Glu Lys Ser Thr Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Glu
 85 90 95

Lys Leu Thr Ala Ala Phe Lys Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Pro
 100 105 110

Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys

115	120	125
Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile		
130	135	140
Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val		
145	150	155
Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg		
165	170	175
Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Lys		
180	185	190
Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys Ala		
195	200	205
Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Val Asp Ala Lys Glu Gln Asp Glu Ser		
210	215	220
Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Val Lys Arg Gly Asp Val Gly Glu Gln		
225	230	235
Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser		
245	250	255
Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys Pro Gly Lys Lys		
260	265	270

<210> 32

<211> 437

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 32

Val Ala Ser Leu Phe Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Lys Glu
 1 5 10 15

Val Thr Thr Gln Val Ala Thr Ser Ser Asn Lys Ala Asn Lys Ser Gln
 20 25 30

Thr Glu His Met Lys Ala Ala Lys Gln Val Asp Glu Tyr Ile Lys Lys
 35 40 45

Lys Leu Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Val Gly Leu Leu
 50 55 60

Thr Lys Leu Gly Val Ile Lys Thr Glu Tyr Leu His Gly Leu Ser Val
 65 70 75 80

Ser Lys Lys Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Ile Lys Ala Lys
 85 90 95

Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr Glu
 100 105 110

Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys
 115 120 125

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Leu Arg Asn Tyr Pro Thr
 130 135 140

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Asp Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu
 145 150 155 160

Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser
 165 170 175

Arg Asp Glu Lys Lys Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Asn Lys
 180 185 190

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Asn Ile Lys Thr Asp Arg Glu Lys
 195 200 205

Ala Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Leu Gln Glu Ala Asn
 210 215 220

Val Ala Thr Ser Glu Gln Asp Lys Ser Lys Arg Arg Ala Lys Arg Glu
 225 230 235 240

Val Phe Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys
 245 250 255

Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Thr Ser Pro Ser Leu
 260 265 270

420

425

430

Asp Gln Gln Ala Glu

435

<210> 33

<211> 433

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 33

Cys Thr Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu

1 5 10 15

Asn Glu Arg Thr Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Gly Lys Pro

20 25 30

Glu Arg Arg Lys Ala Ala Glu Gln Phe Asp Glu Tyr Ile Asn Lys Met

35 40 45

Ile Gln Leu Asp Lys Arg Lys His Thr Gln Asn Leu Ala Phe Asn Ile

50 55 60

Gln Leu Ser Arg Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Asn Gly Leu Lys Glu Lys

65 70 75 80

Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Lys Ile Lys Ala Glu Leu Asp Ala Ala

85 90 95

Phe Lys Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro Thr Glu Pro Glu Lys Lys
 100 105 110

Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala
 115 120 125

Glu Ala Lys Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp His Arg Asn
 130 135 140

Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Asp Leu Glu Ile Ala Glu Phe
 145 150 155 160

Asp Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Lys Glu Ala
 165 170 175

Asp Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val
 180 185 190

Glu Ser Glu Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp
 195 200 205

Arg Glu Lys Ala Glu Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys
 210 215 220

Glu Gln Asp Glu Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Gly Lys Arg Gly Ala
 225 230 235 240

Leu Gly Glu Gln Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser

Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys

260 265 270

Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Asp

275 280 285

Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr

290 295 300

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Lys

305 310 315 320

Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Ser

325 330 335

Arg Asn Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys

340 345 350

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys

355 360 365

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys

370 375 380

Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu

385 390 395 400

Lys Pro Ala Glu Glu Pro Glu Asn Pro Val Pro Ala Pro Lys Pro Glu
 405 410 415

Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala
 420 425 430

Glu

<210> 34

<211> 427

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 34

Val Ala Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu
 1 5 10 15

Lys Glu Val Thr Thr Gln Val Pro Thr Tyr Ser Asn Met Ala Lys Thr
 20 25 30

Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu Lys
 35 40 45

Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn Phe
 50 55 60

Ala Phe Asn Met Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Glu Tyr Leu Tyr Gly

65	70	75	80
Leu Lys Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Pro Ser Glu Val Lys Ala Lys			
	85	90	95
Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Lys Leu Gly			
	100	105	110
Glu Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys			
	115	120	125
Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr			
	130	135	140
Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys			
	145	150	155
			160
Lys Ala Glu Leu Glu Leu Leu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Arg Asn Glu			
	165	170	175
Asp Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu Ser Lys Lys Ala Glu			
	180	185	190
Ala Thr Lys Leu Glu Glu Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu			
	195	200	205
Glu Ala Lys Arg Lys Ala Glu Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys Asp Lys			
	210	215	220

Gln Pro Ala Pro Ala Pro Gln Pro Glu Lys Pro Thr Glu Glu Pro Glu
 385 390 395 400

Asn Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Lys
 405 410 415

Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 420 425

<210> 35

<211> 413

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 35

Glu Asn Glu Gly Ser Thr Gln Ala Ala Thr Ser Ser Asn Met Ala Lys
 1 5 10 15

Thr Glu His Arg Lys Ala Ala Lys Gln Val Val Asp Glu Tyr Ile Glu
 20 25 30

Lys Met Leu Arg Glu Ile Gln Leu Asp Arg Arg Lys His Thr Gln Asn
 35 40 45

Val Ala Leu Asn Ile Lys Leu Ser Ala Ile Lys Thr Lys Tyr Leu Arg
 50 55 60

Thr Gln Pro Glu Lys Pro Ala Pro Lys Pro Glu Lys Pro Ala Glu Gln
 385 390 395 400

Pro Lys Ala Glu Lys Thr Asp Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 405 410

<210> 36

<211> 425

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 36

Tyr Ile Ala Ser Leu Phe Leu Gly Gly Val Val His Ala Glu Gly Val
 1 5 10 15

Arg Ser Glu Asn Asn Pro Thr Val Thr Ser Ser Gly Gln Asp Ile Ser
 20 25 30

Lys Lys Tyr Ala Asp Glu Val Lys Ser His Leu Glu Lys Ile Leu Ser
 35 40 45

Glu Ile Gln Thr Asn Leu Asp Arg Ser Lys His Ile Lys Thr Val Asn
 50 55 60

Leu Ile Asn Lys Leu Gln Asp Ile Lys Arg Thr Tyr Leu Tyr Glu Leu
 65 70 75 80

Asn Val Leu Glu Asp Lys Ser Lys Ala Glu Leu Pro Ser Lys Ile Lys
 85 90 95

Ala Glu Leu Asp Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu Pro
 100 105 110

Thr Glu Pro Gly Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu Glu
 115 120 125

Ala Glu Lys Lys Ala Lys Ala Gln Lys Glu Glu Asp Tyr Arg Asn Tyr
 130 135 140

Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp
 145 150 155 160

Val Lys Val Lys Glu Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Lys Glu Ala Asp
 165 170 175

Glu Ser Arg Asn Glu Gly Thr Ile Asn Gln Ala Lys Ala Lys Val Glu
 180 185 190

Ser Glu Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp Arg
 195 200 205

Glu Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala Asp Ala Lys Glu Gln
 210 215 220

Asp Glu Ser Lys Arg Arg Lys Ser Arg Val Lys Arg Gly Asp Phe Gly

65	70	75	80
Leu Glu Glu Lys Ser Glu Ala Glu Leu Thr Ser Lys Thr Lys Glu Thr			
85	90	95	
Lys Glu Glu Leu Thr Ala Ala Phe Glu Gln Phe Lys Lys Asp Thr Leu			
100	105	110	
Ser Thr Glu Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Lys Lys Lys Val Glu			
115	120	125	
Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Lys Asp Arg Arg Asn			
130	135	140	
Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser			
145	150	155	160
Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Val Lys Ala			
165	170	175	
Asn Glu Pro Arg Asp Glu Glu Lys Ile Lys Gln Ala Glu Ala Lys Val			
180	185	190	
Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys Ile Lys Thr Asp			
195	200	205	
Arg Glu Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys Thr Asp Arg			
210	215	220	

Glu Gln Ala Glu Glu Glu Ala Lys Val Lys Asp Glu Pro Lys Lys Arg
 225 230 235 240

Thr Lys Arg Gly Val Leu Gly Glu Pro Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu
 245 250 255

Asn Asp Ala Lys Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro
 260 265 270

Ser Pro Ser Leu Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys
 275 280 285

Val Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg
 290 295 300

Arg Asn Tyr Pro Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala
 305 310 315 320

Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu
 325 330 335

Glu Ala Lys Glu Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala
 340 345 350

Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Asn Ile Lys
 355 360 365

Thr Asp Arg Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu
 370 375 380

Asp Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val Gly
 50 55 60

Glu Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val Ala
 65 70 75 80

Leu Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys Ile
 85 90 95

Val Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu Ser
 100 105 110

Arg Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser Ser
 115 120 125

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp Thr
 130 135 140

Ala Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala
 145 150 155 160

Lys Lys Lys Val Glu Glu Ala Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu
 165 170 175

Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu
 180 185 190

Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu
 195 200 205

Val Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Glu Gln Lys Ile Lys Gln
 210 215 220

Ala Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys
 225 230 235 240

Lys Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg
 245 250 255

Ala Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Ala Lys Arg Gly
 260 265 270

Val Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys
 275 280 285

Ser Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu
 290 295 300

Lys Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala
 305 310 315 320

Lys Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro
 325 330 335

Thr Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val
 340 345 350

Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu

355

360

365

Pro Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser
 370 375 380

Lys Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys
 385 390 395 400

Lys Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val
 405 410 415

Lys Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Ala
 420 425 430

Glu Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro
 435 440 445

Lys Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 450 455 460

<210> 39

<211> 459

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 39

Ile Val Ala Ser Leu Val Met Gly Ser Val Val His Ala Thr Glu Asn
 1 5 10 15

Glu Gly Ala Thr Gln Val Pro Thr Ser Ser Asn Arg Ala Asn Glu Ser
 20 25 30

Gln Ala Glu Gln Gly Glu Gln Pro Lys Lys Leu Asp Ser Glu Arg Asp
 35 40 45

Lys Ala Arg Lys Glu Val Glu Glu Tyr Val Lys Lys Ile Val Gly Glu
 50 55 60

Ser Tyr Ala Lys Ser Thr Lys Lys Arg His Thr Ile Thr Val Ala Leu
 65 70 75 80

Val Asn Glu Leu Asn Asn Ile Lys Asn Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Val
 85 90 95

Glu Ser Thr Ser Glu Ser Gln Leu Gln Ile Leu Met Met Glu Ser Arg
 100 105 110

Ser Lys Val Asp Glu Ala Val Ser Lys Phe Glu Lys Asp Ser Ser Ser
 115 120 125

Ser Ser Ser Ser Asp Ser Ser Thr Lys Pro Glu Ala Ser Asp Thr Ala
 130 135 140

Lys Pro Asn Lys Pro Thr Glu Pro Gly Glu Lys Val Ala Glu Ala Lys
 145 150 155 160

Lys Lys Val Glu Glu Val Glu Lys Lys Ala Lys Asp Gln Lys Glu Glu

165	170	175	
Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr Ile Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu			
180	185	190	
Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val			
195	200	205	
Lys Val Lys Ala Asn Glu Pro Arg Asp Lys Gln Lys Ile Lys Gln Ala			
210	215	220	
Glu Ala Glu Val Glu Ser Lys Gln Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Lys			
225	230	235	240
Ile Lys Thr Asp Arg Glu Glu Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Arg Ala			
245	250	255	
Asp Ala Lys Glu Gln Gly Lys Pro Lys Gly Arg Pro Lys Arg Gly Val			
260	265	270	
Pro Gly Glu Leu Ala Thr Pro Asp Lys Lys Glu Asn Asp Ala Lys Ser			
275	280	285	
Ser Asp Ser Ser Val Gly Glu Glu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Leu Lys			
290	295	300	
Pro Glu Lys Lys Val Ala Glu Ala Glu Lys Lys Val Glu Glu Ala Lys			
305	310	315	320

Lys Lys Ala Glu Asp Gln Lys Glu Glu Asp Arg Arg Asn Tyr Pro Thr
 325 330 335

Asn Thr Tyr Lys Thr Leu Glu Leu Glu Ile Ala Glu Ser Asp Val Glu
 340 345 350

Val Lys Lys Ala Glu Leu Glu Leu Val Lys Glu Glu Ala Lys Glu Pro
 355 360 365

Arg Asn Glu Glu Lys Val Lys Gln Ala Lys Ala Glu Val Glu Ser Lys
 370 375 380

Lys Ala Glu Ala Thr Arg Leu Glu Lys Ile Lys Thr Asp Arg Lys Lys
 385 390 395 400

Ala Glu Glu Glu Ala Lys Arg Lys Ala Ala Glu Glu Asp Lys Val Lys
 405 410 415

Glu Lys Pro Ala Glu Gln Pro Gln Pro Ala Pro Ala Pro Lys Thr Glu
 420 425 430

Lys Pro Ala Pro Ala Pro Lys Pro Glu Asn Pro Ala Glu Gln Pro Lys
 435 440 445

Ala Glu Lys Pro Ala Asp Gln Gln Ala Glu Glu
 450 455

(57) 청구의 범위

청구항 1

N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 1에 제시된 분리된 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 3에 제시된 분리된 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 아미노산 서열이 서열 6에 제시된 분리된 폴리펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 7에 제시된 분리된 폴리펩티드.

청구항 6

제1항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 9에 제시된 분리된 폴리펩티드.

청구항 7

서열 24에 제시된 아미노산을 갖는 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하고, 3차 구조를 나타내는 분리된 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 3차구조가 천연 단백질에 존재하는 3차구조에 상응하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 9

제7항에 있어서, 폴리펩티드가, 콜린 결합 단백질 A를 제475번 아미노산에서 절단함으로써 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물을 형성하는 하이드록실아민으로 전장 콜린 결합 단백질 A를 절단함으로써 생성되는, 분리된 폴리펩티드.

청구항 10

제1항의 폴리펩티드의 분리된 동족체.

청구항 11

제10항에 있어서, 동족체가 N-말단 메티오닌 또는 N-말단 폴리히스티딘을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 단편이 폴리펩티드의 단백질 분해 생성물인 분리된 폴리펩티드.

청구항 13

폴리펩티드가 렉틴 활성을 가지며 콜린에 결합하지 않는, N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 폴리펩티드.

청구항 14

N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 면역원성 폴리펩티드.

청구항 15

제14항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 1에 제시된 면역원성 폴리펩티드.

청구항 16

제14항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 3에 제시된 면역원성 폴리펩티드.

청구항 17

제14항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 7에 제시된 면역원성 폴리펩티드.

청구항 18

제14항에 있어서, 폴리펩티드의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 아미노산 서열이 서열 9에 제시된 면역원성 폴리펩티드.

청구항 19

N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산.

청구항 20

제19항에 있어서, 핵산의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 핵산이 서열 12에 제시된 분리된 핵산.

청구항 21

제19항에 있어서, 핵산의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 핵산이 서열 14에 제시된 분리된 핵산.

청구항 22

제19항에 있어서, 핵산의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 핵산이 서열 17에 제시된 분리된 핵산.

청구항 23

제19항에 있어서, 핵산의 단편, 돌연변이체, 변형체, 동족체 또는 유도체를 포함하는, 핵산이 서열 19에 제시된 분리된 핵산.

청구항 24

제19항에 있어서, 핵산이 DNA인 분리된 핵산.

청구항 25

제19항에 있어서, 핵산이 cDNA인 분리된 핵산.

청구항 26

제19항에 있어서, 핵산이 게놈성 DNA인 분리된 핵산.

청구항 27

제19항에 있어서, 핵산이 RNA인 분리된 핵산.

청구항 28

제19항에 있어서, 핵산이 RNA 전사의 프로모터에 작동적으로 결합된 분리된 핵산.

청구항 29

제19항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서, 프로모터가 박테리아, 효모, 곤충 또는 포유동물의 프로모터를 포함하는 벡터.

청구항 31

제30항에 있어서, 벡터가 플라스미드, 코스미드, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리오파지 또는 진핵세포성 바이러스 DNA인 벡터.

청구항 32

적합한 숙주 세포 내에서 제30항의 벡터를 포함하는 폴리펩티드를 생성하기 위한 숙주 벡터 시스템.

청구항 33

제32항에 있어서, 적합한 숙주 세포가 원핵 세포 또는 진핵 세포인 숙주 벡터 시스템.

청구항 34

제19항의 핵산을 포함하는 세포주.

청구항 35

- (a) 제19항의 벡터를 적합한 숙주 세포내로 도입시키는 단계;
- (b) 생성된 숙주 세포를 배양하여 폴리펩티드를 생산하는 단계;
- (c) 단계 (b)에서 생산된 폴리펩티드를 회수하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)에서 회수된 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하여, 폴리펩티드를 정제된 형태로 수득하는 방법.

청구항 36

제1항 또는 제7항의 폴리펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 항체.

청구항 37

제36항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인 항체.

청구항 38

제36항에 있어서, 항체가 폴리클로날 항체인 항체.

청구항 39

제36항에 있어서, 항체가 키메라성 (이중 특이적) 항체인 항체.

청구항 40

제1항의 폴리펩티드 및 억제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 억제학적 조성물.

청구항 41

환자에게 제40항의 억제학적 조성물을 투여함으로써 면역 반응을 유도함을 포함하여, 폐렴균 (pneumococcal bacterium)에 노출되거나 이에 감염된 환자에서 면역 반응을 유도하는 방법.

청구항 42

환자에게 폐렴균 감염을 막기에 효과적인 제40항의 억제학적 조성물을 투여함으로써 폐렴균에 의한 감염

을 방지함을 포함하여, 환자에서 폐렴균에 의한 감염을 방지하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 약제학적 조성물이 기도 또는 비인강에 전달되는 방법.

청구항 44

환자에게 제36항의 항체 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 투여함으로써 폐렴균에 의한 감염을 방지함을 포함하여, 환자에서 폐렴균에 의한 감염을 방지하는 방법.

청구항 45

제1항의 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용가능한 보강제 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 46

제45항에 있어서, 폴리펩티드가 서열 1, 3 내지 7, 9 내지 11, 22 및 23 중의 어떤 것에 제시된 아미노산 서열을 갖는 백신.

청구항 47

제45항에 있어서, 폴리펩티드가 도 2에 제시된 N-말단 콜린 결합 단백질 A 절단물의 아미노산 서열을 포함하는 백신.

청구항 48

도 2에 제시된 보존 영역을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 약제학적으로 허용가능한 보강제 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 49

제48항에 있어서, 보존 영역이 아미노산 서열 158 내지 172; 300 내지 321; 331 내지 339; 355 내지 365; 367 내지 374; 379 내지 389; 409 내지 427; 및 430 내지 447로 부터 선택되는 백신.

청구항 50

제1항의 폴리펩티드를 암호화하는 분리된 핵산 및 약제학적으로 허용가능한 보강제 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 51

제19항의 분리된 핵산 및 약제학적으로 허용가능한 보강제 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 52

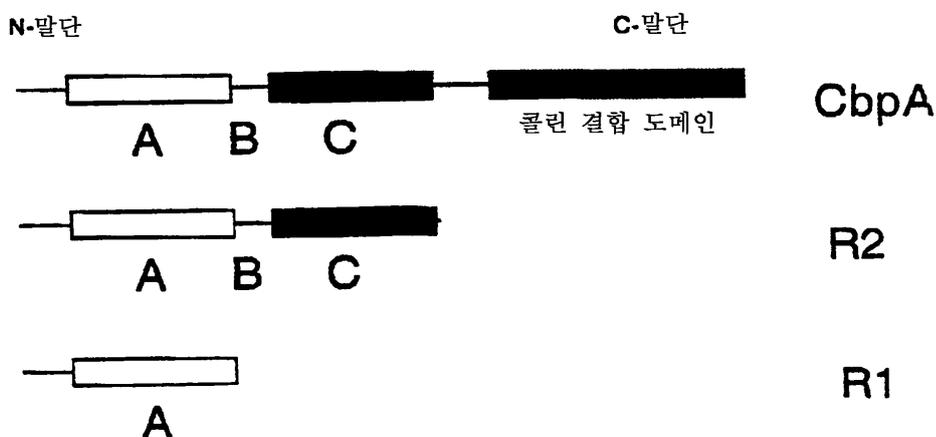
제29항의 벡터 및 약제학적으로 허용가능한 보강제 또는 담체를 포함하는 백신.

청구항 53

환자에게 치료학적 유효량의 제45항 내지 제51항 또는 제52항 중의 어떤 항의 백신을 투여함으로써 환자를 치료함을 포함하여, 폐렴균에 감염되거나 이에 노출된 환자를 치료하는 방법.

도면

도면1



도면2b

	22c	230	240	250	260	270	280
SPB328(23F) Cbp	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						227
SPB365(23F) Cbp	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						227
SPB105(68) CbpA	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						230
SPS712(19A) Cbp	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						234
SPB331(14) CbpA	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						226
SPR332(9V) CbpA	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						229
ATCC2 CbpA trun	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						222
R6X(2) CbpA trn	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						213
SPS79(14) CbpA	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						227
ATCC6B CbpA trn	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						234
Ntype4 CbpA trn	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						261
ATCC4 CbpA trun	KKAELELVKKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE--AKRRADAKLQEA---NVA						260

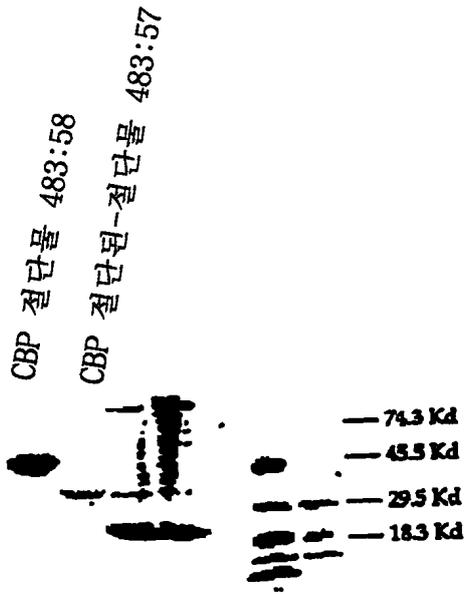
	290	300	310	320	330	340	350
SPB328(23F) Cbp	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						297
SPB365(23F) Cbp	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						297
SPB105(68) CbpA	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						300
SPS712(19A) Cbp	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						291
SPB331(14) CbpA	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						296
SPR332(9V) CbpA	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						295
ATCC2 CbpA trun	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						288
R6X(2) CbpA trn	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						283
SPS79(14) CbpA	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						293
ATCC6B CbpA trn	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						300
Ntype4 CbpA trn	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						328
ATCC4 CbpA trun	TSBQKSKRABRBYLQSLA--PDKKENDAKSSDSSVGEETL/SPSLKPKKVAEABKQKVEAKQKAEQK						327

	350	370	380	390	400	410	420
SPB328(23F) Cbp	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						367
SPB365(23F) Cbp	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						367
SPB105(68) CbpA	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						370
SPS712(19A) Cbp	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						361
SPB331(14) CbpA	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						366
SPR332(9V) CbpA	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						365
ATCC2 CbpA trun	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						358
R6X(2) CbpA trn	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						353
SPS79(14) CbpA	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						363
ATCC6B CbpA trn	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						370
Ntype4 CbpA trn	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						398
ATCC4 CbpA trun	EDRRNYPNTYKLELEIAESDVEKKAELVKEAKESRDEKINQAKAVESKQAEATRLKJNTITREKAE						397

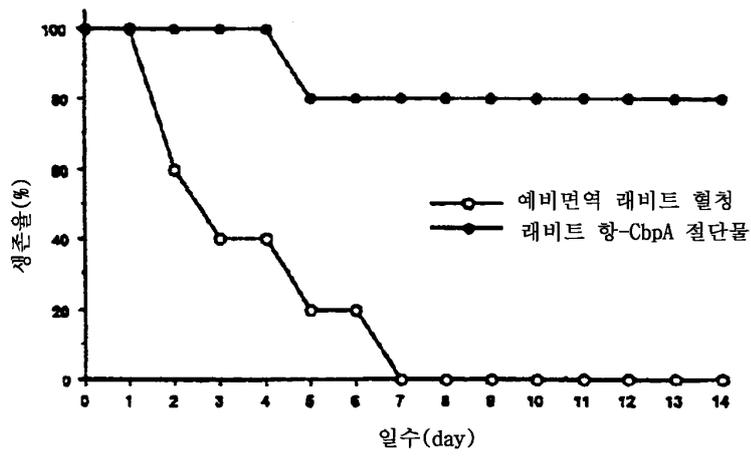
	430	440	450	460	470	480	490
SPB328(23F) Cbp	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						437
SPB365(23F) Cbp	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						437
SPB105(68) CbpA	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						437
SPS712(19A) Cbp	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						419
SPB331(14) CbpA	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						436
SPR332(9V) CbpA	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						432
ATCC2 CbpA trun	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						425
R6X(2) CbpA trn	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						411
SPS79(14) CbpA	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						423
ATCC6B CbpA trn	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						437
Ntype4 CbpA trn	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						458
ATCC4 CbpA trun	KKGAEE--AKRGAEEEDKVKKPAEQPPAPAPQPPKPAEQPPAPAP--PKPQPPAPAPQPPKPAEQPPA						457

SPB328(23F) Cbp EE							439
SPB365(23F) Cbp							437
SPB105(68) CbpA EE							439
SPS712(19A) Cbp							419
SPB331(14) CbpA E							437
SPR332(9V) CbpA E							433
ATCC2 CbpA trun EE							427
R6X(2) CbpA trn EE							413
SPS79(14) CbpA EE							425
ATCC6B CbpA trn EE							439
Ntype4 CbpA trn EE							460
ATCC4 CbpA trun EE							459

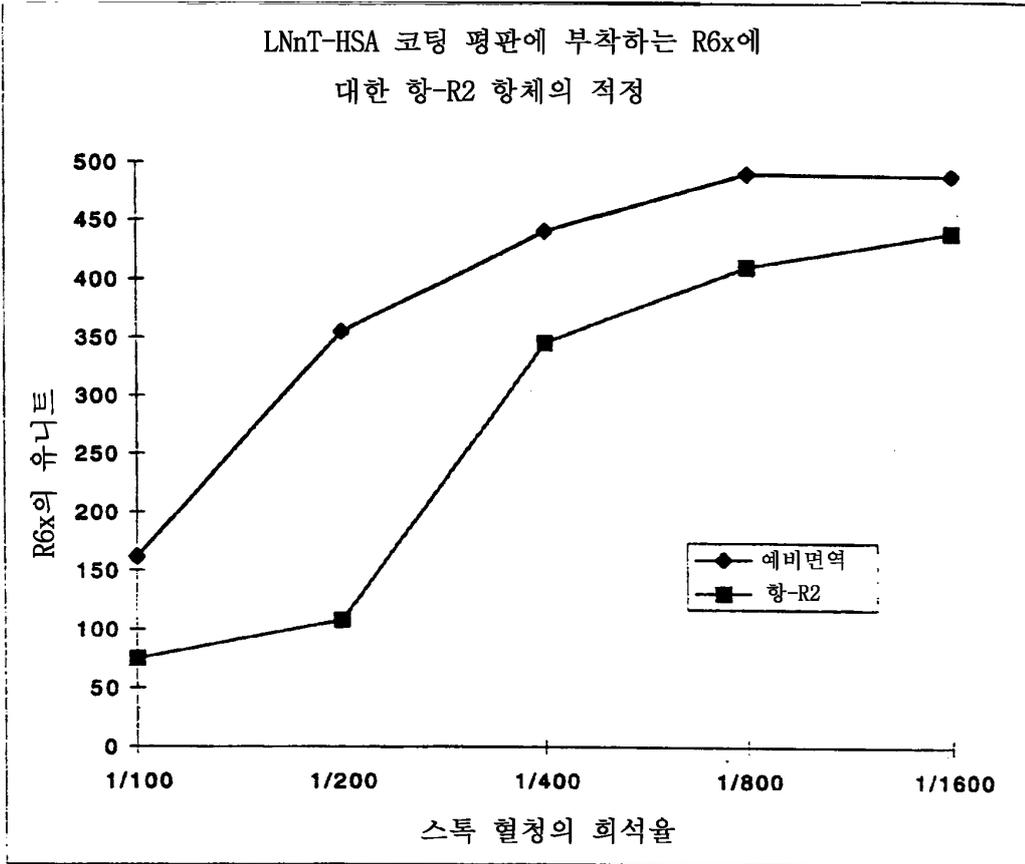
도면3



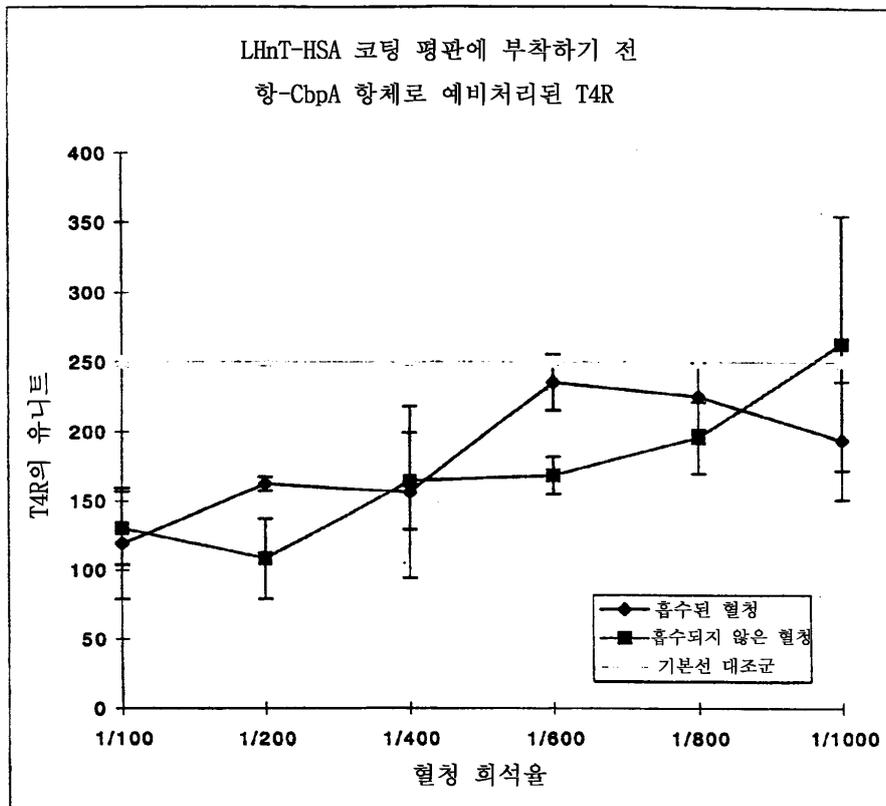
도면4



도면5



도면6



도면7

능동 보호

